

Hydrofluoric acid 용액을 이용한 유리 커버글라스에 배양된 신경세포의 전자현미경 시료제작법

오 현 우, 박 호 용*
한국생명공학연구원 곤충자원연구실

TEM Sample Preparation for Cultured Neurons on a Glass Coverslip

Hyun Woo Oh and Ho-Yong Park*
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
(Received September 29, 2005; Accepted November 18, 2005)

ABSTRACT

Cultured neurons from *Drosophila* brain on a glass coverslip to understand the structural basis of synapse were prepared for TEM observations. Neurons on a coverslip were fixed, dehydrated and embedded in Epon without separating from coverslip. After polymerization, the block was placed in 49% hydrofluoric acid to remove the coverslip. The block was examined under a light microscope to select exact neurons, then trimmed and sectioned for TEM observation.

Key words : Cell culture, Glass coverslip, Hydrofluoric acid, Synapse

서 론

최근 신경전달에 대한 연구는 각종 현미경기술의 발전(Betz & Bewick, 1992; Betz et al., 1992)으로 이를 배양된 해마(hippocampus) 신경세포에 적용함으로써(Ryan et al., 1996) 많은 진전을 이루고있다. 이렇게 중추신경에 대해 많은 연구들이 이루어지고 있지만 너무 복잡하고 다양한 결과들로 인하여 아직도 그 해석에 어려움이 많은 것도 사실이다. 그러므로 많은 실험실에서 중추신경조직 자체 보다는 상대적으로 구조가 간단하고, 개별 신경세포의 신경전달에 대해서 보다

정확한 해석을 할 수 있다는 장점으로 중추신경세포를 배양하여 신경전달에 대한 보다 정확한 이해와 해석을 얻고자 노력중이다. 특히 해마 신경세포를 배양하여 얻은 신경연접에 관한 최근의 연구 결과(Harris & Sultan, 1995; Schikorski & Stevens, 1997)는 전기생리학적인 관점과 신경세포의 구조적 특성을 통계 처리함으로써 보다 정확한 신경전달에 대한 이해를 가져왔다.

초파리를 이용한 신경생리학의 연구는 신경계의 발달과 기능에 관련된 유전자를 행동학적 측면과 생화학적 측면에서 쉽게 접근할 수 있다는 장점으로 많이 이용되고 있으며, 그 결과 배양된 초파리의 신경세포

본 연구는 2005년도 한국생명공학연구원(KRIBB) 기관고유사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

*Correspondance should be addressed to Dr. Ho-Yong Park, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Eun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea. Ph.: (042) 860-4650, FAX: (042) 860-4659, E-mail: hypark@kribb.re.kr

로부터 voltage-gated 이온채널과 전기적 흥분성의 발전에 관한 사실들이 밝혀졌다(O'Dowd, 1995; O'Dowd et al., 1995; Tsunoda & Salkoff, 1995; Zhao & Wu, 1997).

그러나 아직까지 배양신경 세포의 신경연접에 대한 미세구조 연구에는 많은 기술적 어려움과 제약이 따르므로, 본 논문에서는 현재 국내외적으로 활발히 진행되고 있는 배양 신경세포의 전자현미경 관찰을 위한 시료제작법을 제시하고자 한다. 특히 신경세포의 배양은 전기생리학적인 실험과 세포내의 이온 농도를 위한 각종 imaging 실험을 위하여 유리 커버글라스에서 이루어 지는 경우가 많으므로 유리 커버글라스에 배양된 신경세포의 전자현미경 관찰을 위한 편리한 시료제작법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 신경세포 배양

본 연구에서는 초파리 야생종의 뇌로부터 신경세포를 배양하여 실험에 이용하였다. 실험에 이용된 초파리는 용화 후 50-78시간의 용으로부터 머리부분을 떼어내어 두피점질을 벗겨 시엽부분을 잘라낸 후 뇌만을 세절하여 초파리의 뇌신경세포를 배양하였다. 먼저 세절된 뇌조직을 1 mg/mL sodium bicarbonate, 20 mM HEPES, 100 μ M putrescine, 30 nM sodium selenite, 20 ng/mL progesterone, 50 μ g/mL insulin, 100 μ g/mL transferrin, 1 μ g/mL 20-hydroxyecdysone이 첨가된 Ham's F-12 DMEM (high glucose) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)으로 구성된 Drosophila-defined culture medium (DDM2)으로서 세척하였다. 그 다음 35 mm 플라스틱 용기 내에 위치한 concanavalin A (Con A)-laminin-coated (Kraft et al., 1998) glass coverslip에 5 μ L의 DDM2 배지를 떨어뜨린 후, 하나의 세절된 뇌를 옮기고, 물리적 힘을 가하여 조직을 분리하였으며, 이를 30분간 안정화하였다. 그 다음 각 dish에 1.5 mL DDM2를 채우고 습도가 조절된 23°C CO₂ incubator (5% CO₂)에서 24시간 유지한 후, DDM2와 conditional neurobasal medium (cNBM,

neurobasal medium containing B27 supplements; Invitrogen, Gaithersburg, MD)이 각각 3:1로 혼합된 배지 0.5 mL을 각 dish에 첨가하였다. 이때 cNBM은 non-neuronal mouse brain feeder cell cultures (Hilgenberg et al., 1999)로서 24시간 전 처리된 것을 말하며, 그 후 매 4~5일마다 1 mL의 배지를 제거하고 DDM2와 cNBM 3:1 혼합액 1 mL를 새로 첨가하여 배양하였다.

2. 고정

원형 유리 커버글라스(직경 12 mm) 위에서 초파리 신경세포가 배양된 4일째 되는 날 유리 커버글라스 전체를 2% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8)에 1시간동안 전 고정하고 인산완충용액 (4°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8)으로 수회 세척한 후, 얼음위에서 1% OsO₄ (0.1 M phosphate buffer, pH 6.8)로 1시간동안 후고정하였다. 일반적으로 신경세포의 관찰에 있어서 고정액의 조성에 따라 시냅스 소포의 크기와 모양이 영향을 받는다 (Korneliussen, 1972; Nakajima, 1974)고 하였으므로 고정액과 완충용액의 농도, pH, 온도, 고정시간을 항상 정확하게 유지하였다. 또한 신경세포가 배양된 유리 커버글라스 전체를 고정하는 것이므로 시료제작중의 물리적인 손상을 피하기 위하여 신경세포가 배양된 면을 정확히 파악하여 배양된 면이 항상 위를 향하도록 주의하였다. 2차 고정은 얼음 위에서 실시하였으며 contrast를 높여주기 위하여 2차 고정액으로 1% osmium/ferrocyanide 고정액을 만들어 사용하기도 하였다. 1% osmium/ferrocyanide 고정액은 6 mL의 0.1 M phosphate buffer에 0.08 g의 potassium ferrocyanide와 2 mL의 4% osmium tetroxide를 섞어서 만들었다. Potassium ferrocyanide는 잘 녹지 않으므로 사용직전에 초음파 세척기(sonicator)를 이용하여 충분히 녹인 후 얼음 위에 잠시 보관했다가 사용하였다. 전체적으로 신경세포 조직들의 높은 contrast를 확보하기 위하여 2차 고정이 끝난 후 1시간동안 *En Bloc* 염색을 실시하였다.

모든 고정이 끝난 재료는 동일 인산완충용액으로 충분히 세척한 후, ethanol 농도 상승순으로 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 Epon812로 포매한 후,

50°C에서 24시간, 60°C에서 48시간 열중합 하였다.

3. 유리 커버글라스 제거

열중합 반응이 끝난 시료 블록은 유리 커버글라스의 바깥면을 칼이나 메스와 같이 날카로운 도구를 이용하여 유리 커버글라스의 바깥면에 얇게 코팅된 포매제를 일차적으로 긁어내어 유리 커버글라스를 완전히 노출시켰다. 이렇게 유리 커버글라스가 완전히 노출된 시료 블록을 48% hydrofluoric acid (Aldrich) 용액이 들어있는 플라스틱 비이커에 유리면이 밑으로 가도록 5~10분 동안 집어 넣어 유리 커버글라스를 제거하였다. 유리 커버글라스가 제거된 시료 블록은 흐르는 물에서 충분히 세척하고 상온에서 건조 시켰다.

4. 절편 제작 및 관찰

유리 커버글라스가 제거된 시료 블록은 실제 현미경을 이용하여 관찰하고자 하는 부위를 선정한 후 절삭을 실시하였다. 이때 실제 현미경으로 관찰할 수 있는 배율에는 한계가 있으므로 정확한 부위보다는 신경세포를 기준으로 관심이 있는 부위를 선정하여 절삭을 실시하였다. 신경세포들은 이차고정으로 인하여 신경세포들이 겹쳐 변한 것을 기준으로 구별 가능하였다. 절삭된 시료 블록은 세심한 주의를 기울여 시료면과 Diamond knife가 정확히 평행이 되도록 ultramicrotome (Ultracut E, Leica)에 설치하였으며, 설치된 시료블록으로부터 초박편절편(60~70 nm)을 제작하였다.

제작된 연속 초박절편은 formvar coated single hole grid에 부착시키고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (CM10, Philips)으로 가속전압 60 kV에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

유리 커버글라스에 배양된 신경세포의 시료제작 순서는 일반적인 전자현미경 시료제작 순서와 큰 차이가 없었으나, 유리 커버글라스를 제거하고 절편 제작을 위해 시료 블록을 초박절편기에 고정시키는 단계

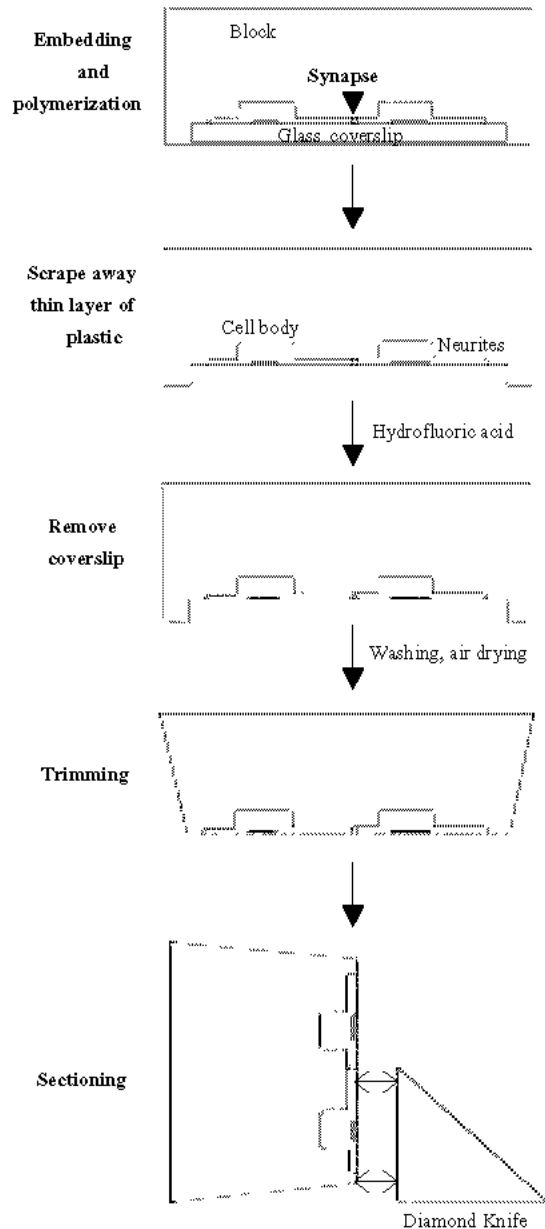


Fig. 1. Schematic showing of experimental procedure for processing cultured neuronal specimens after polymerization for ultrastructural analysis of synapses.

에서 보다 세심한 주의가 필요하였다 (Fig. 1). 얇고 작은 원형 유리 커버글라스 위에 배양된 신경세포의 경우, 전자현미경 관찰을 위한 시료 제작시 전반적으로

유리 커버글라스를 다루는데 세심한 주의가 필요하였다. 유리 커버글라스의 두께가 얇아 (<100 μm) 유리 커버글라스에 배양된 신경세포를 고정, 수세, 또는 탈수하는 과정에서 유리 커버글라스를 다루다가 부서지는 경우가 많았다. 그러므로 항상 유리 커버글라스의 취급에 세심한 주의를 기울이고 유리 커버글라스의 이동을 최소한으로 제한하는 것이 성공적인 시료제작에 도움을 주었다. 또한 모든 전처리 과정에서 배양된 신경세포의 물리적 손상을 방지하기 위하여 신경세포가 배양된 면과 그렇지 않은 면을 정확히 구분하여야 배양된 신경세포가 항상 위를 향하도록 하였다. 특히 전자현미경 시료 제작의 마지막 단계에 속하는 포매시에는 세포가 배양된 면이 반드시 블록의 내부를 향하도록 하여 유리 커버글라스를 제거할 때 배양된 세포들도 같이 제거되지 않도록 주의하였다. 유리 커버글라스를 포매하기 위해서는 시중에서 판매되고 있는 PELCO사의 disk block embedding 원형 몰드를 구입하여 이용하였다 (Fig. 2A). 유리 커버글라스를 원형 몰드의 중앙에 위치시키고 Epon 혼합물을 조심스럽게 채우고 상온에서 2시간 정도 방치한 후 50°C 오븐에서 24시간, 60°C 오븐에서 48시간 동안 열중합시켰다. 중합반응이 끝난 시료 블록은 오븐에서 꺼내어 1시간 정도 상온에서 식힌 후 유리 커버글라스의 바깥면을 칼이나 메스와 같이 날카로운 도구를 이용하여 유리 커버글라스의 바깥면에 얇게 코팅된 포매제를 일차적으로 긁어내어 유리 커버글라스를 완전히 노출시켰다. 유리 커버글라스가 완전히 노출된 시료 블록은 48% hydrofluoric acid 용액을 이용하여 시료 블록으로부터 유리 커버글라스를 제거하였다 (Fig. 2B, C). 시료 블록으로부터 유리 커버글라스를 제거하기 위하여 48% hydrofluoric acid 용액에 담글 때에는 반드시 유리 커버글라스가 있는 면이 아래를 향하도록 유지하였다. 정확한 이유는 알 수 없었지만, 유리 커버글라스가 위를 향할 경우 유리 커버글라스가 잘 제거되지 않았으며, 완전히 제거하기 위하여 1시간 이상 용액에 처리해야 하는 경우도 있었다. 유리 커버글라스가 제거된 시료 블록은 조심스럽게 꺼내어 흐르는 물로 충분히 세척하고 상온에서 건조한 후 사용하였다. 이때 용액에 담겨 두는 시간이 길고 세척하는 시간이 길어지면 시료블록이 불투명하게 변하면서 시료블록이 흐

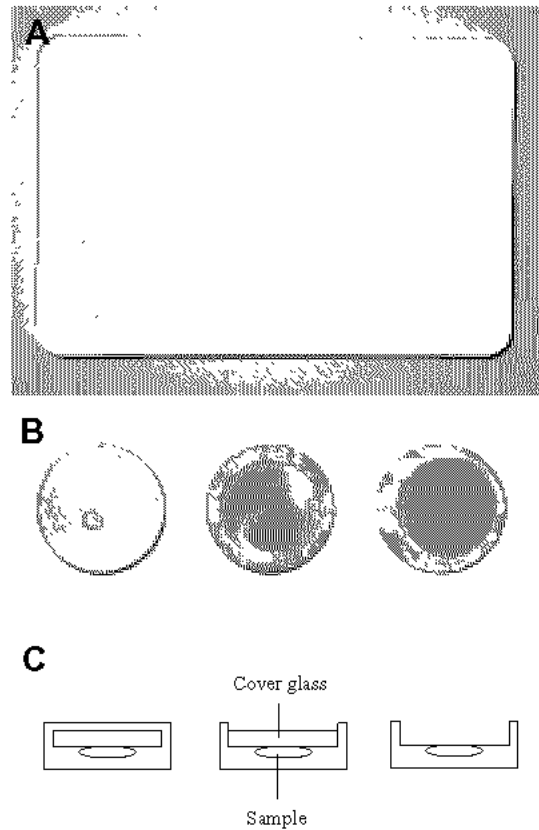


Fig. 2. A) Disk block embedding mold were convenient for round cover slip. The coverslips were embedded in disk block embedding mold. B) After polymerization, the specimen block was took out from mold (Left). The thin layer of plastic on the backside of the coverslip was scraped away (Middle). After the coverslip was exposed, the specimen block was placed in a plastic beaker of hydrofluoric acid to remove the coverslip. It usually took 10 to 15 minutes for the coverslip to dissolve completely (Right). C) Diagrammatic representation showing the status of specimen block distinctly.

물흐물해지는 경우가 생겼는데, 이럴 경우에는 상온에서 물기를 충분히 건조시킨 후 60°C 오븐에서 1시간 정도 처리한 후 사용하면 특별한 문제가 생기지 않았다. 유리 커버글라스가 제거된 시료 블록은 보다 정확한 관찰부위를 선정하기 위해 실제 현미경을 이용하여 세포몸을 기준으로 관찰부위를 선정한 후 절삭을 실시 하였다.

일반적으로 슬라이드 글라스나 각종 유리 제품에

배양된 세포를 관찰하고자 하는 경우에는 포매 후 중합반응이 끝난 다음 블록을 액체 질소에 넣어서 유리 제품을 깨뜨려 제거하는 방법을 많이 이용하고 있다. 이렇게 시료를 극저온으로 처리하여 유리로부터 분리할 경우 유리 제품의 두께나 상태에 따라서 유리 파편들을 시료 블록으로부터 완전히 제거하는 것이 어렵거나 유리 파편의 완전한 제거를 위해서는 오랫동안의 경험과 기술이 필요하다. 그러므로 처음 전자현미경 시료를 제작하는 경우에는 절삭 또는 절편 제작 시 세포들이 자란 모든 부분을 사용하지 못하고 유리가 제거된 일부분만 사용해야 하는 제약이 있었다. 실제로 본 연구의 경우에도 액체 질소를 이용하여 유리 커버글라스를 제거해본 결과 유리 커버 글라스가 너무 얇은 관계로 유리 파편들이 시료 블록의 여러 곳에 남아있어 유리 파편들을 시료 블록으로부터 완전히 제거할 수가 없었다. 그러나 hydrofluoric acid 용액을 이용하여 유리 커버글라스를 녹여내는 방법을 이용할 경우에는 시료 블록으로부터 유리 커버글라스를 완전히 제거함으로써 관찰하고자 하는 모든 부분을 필요에 따라 임의로 선정하여 절편을 제작할 수 있었다. 물론 이 경우에도 유리 슬라이드 글라스 같이 그 두께가 너무 두꺼우면 사용하기 어렵다는 단점이 있었다.

일단 유리 커버글라스가 제거된 후에는 시료 블록의 표면이 부드러우므로 표면에 흠집이 생기지 않도록 조심하여야 한다. 본 연구의 경우 시료 블록을 49% hydrofluoric acid 용액에 넣어 두는 시간에 따른 시료의 손상을 우려하였으나 최고 30분까지의 처리 후에도 시간에 따른 시료의 구조적 변형이나 손실은 관찰할 수 없었다.

유리 커버글라스에 배양된 신경세포의 종류에 따라 관찰할 수 있는 신경연접을 확인할 수 있는 절편 수가 다르므로 원활한 실험을 위하여 한 개의 유리 커버글라스에 배양된 신경세포로부터 얻을 수 있는 절편의 수를 미리 예측하여야 하였다. 초파리 배양세포의 경우 시료블록의 첫 면부터 약 2 μm 까지에서 만들어진 절편에서만 신경돌기들과 신경연접을 관찰할 수 있었으며, 2~10 μm 까지에서 만들어진 절편에서는 신경세포모양만을 관찰할 수 있었다. 즉 한 개의 절편 두께를 60~70 nm라고 가정할 경우 초파리 신경세포의

경우에는 약 30개 정도의 절편에서만 신경연접의 관찰이 가능하였다. 그러므로 관찰하고자 하는 신경세포의 종류에 따라 배양하는 신경세포들의 성장 특성을 정확히 파악하여 하나의 커버글라스로부터 얼마나 많은 절편을 제작할 수 있는지를 예비실험을 통하여 알아두는 것이 중요하다고 생각된다.

절삭된 시료 표면은 유리 커버글라스가 제거되어 완전히 편평하므로 절편 제작을 위한 블록과 diamond knife와의 평행 유지에 세심한 노력을 하여야 한다. 초파리 배양세포의 경우 신경세포들이 유리 커버글라스위에 거의 단일층으로 성장하고 유리 커버글라스의 바로 위에 신경돌기들이 부착하여 자라므로 시료 블록면과 나이프가 평행되지 않으면 신경연접을 관찰할 수 있는 절편의 수가 현저히 줄어 들었다. 그러므로 유리 커버글라스에 배양된 신경연접의 관찰에 있어서는 시료 블록과 다이아몬드 칼의 평행 유지가 대단히 중요하였다.

이상과 같이 본 논문에서 소개한 hydrofluoric acid 용액으로 유리 커버글라스를 제거하는 방법은 기존에 알려진 액체질소를 이용한 유리재질의 제거법과 함께 신경과학 분야와 같이 배양 신경세포의 미세구조 관찰을 위하여 세포를 유리 커버글라스에 배양하여 전자현미경으로 관찰하기에 편리하고 유용할 뿐만 아니라 다른 여러 분야에서도 미세구조 연구를 위하여 다양한 세포를 유리 커버글라스와 같이 얇은 유리제품에 배양한 후 전자현미경으로 미세구조를 관찰하고 연구하는데 응용될 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- Betz WJ, Bewick GS: Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255 : 200-203, 1992.
- Betz WJ, Mao F, Bewick GS: Activity dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* 12 : 363-375, 1992.
- Fukuda T, Kosaka T: Gap junctions linking the dendritic network of gabaergic interneurons in the hippocampus. *J Neurosci* 20 : 1519-1528, 2000.
- Fukuda T, Kosaka T: Ultrastructural study of gap junctions

- between dendrites of parvalbumin containing gabaergic neurons in various neocortical areas of the adult rat. *Neuroscience* 120 : 5-20, 2003.
- Harris KM, Sultan P: Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology* 34 : 1387-1395, 1995.
- Katz B: The release of neural transmitter substances. Liverpool, England: Liverpool University, 1969.
- Korneliusson H: Elongated profiles of synaptic vesicles in motor endplates. Morphological effects of fixative variations. *J Neurocytol* 1 : 279-296, 1972.
- Luse SA: Electron microscope observations of the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* 2 : 531-542, 1956.
- Nakajima Y: Fine structure of the synaptic endings on the mauthner cell of the gold fish. *J Comp Neurol* 156 : 379-402, 1974
- Palay SL, Palade GE: The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol* 1 : 69-88, 1955.
- Pierce JP, Lewin GR: An ultrastructural size principle. *Neuroscience* 58 : 441-446, 1994.
- Pierce JP, Mendell LM: Quantitative ultrastructure of la boutons in the ventral horn: scaling and positional relationships. *J Neurosci* 13 : 4748-4763, 1993.
- Redman S: Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol Rev* 70 : 165-198, 1990.
- Ryan TA, Ziv NE, Smith SJ: Pointiation of evoked vesicle turnover at individually resolved synaptic boutons. *Neuron* 17 : 125-134, 1996.
- Schikorski T, Stevens CF: Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17 : 5858-5867, 1997.
- Walmsley B, Wieniawa Narkiewicz E, Nicol MJ: The ultrastructural basis for synaptic transmission between primary muscle afferents and neurons in Clarke's column of the cat. *J Neurosci* 5:2095-2106, 1985.

< 국문초록 >

신경연접 구조 관찰을 위한 방법으로 hydrofluoric acid 용액을 이용하여 유리 커버글라스 위에 배양된 신경세포의 전자현미경 관찰을 위한 편리한 시료제작법을 제시하였다. 배양된 신경세포의 TEM관찰을 위한 전체적인 시편제작 방법은 일반적인 전자현미경 시편 준비법과 큰 차이가 없으나 시료 블록을 제작한 후 유리 커버글라스를 효과적으로 제거하는 것이 가장 큰 차이점이다. 유리 커버글라스의 제거를 위해 열충합 반응이 끝난 시료 블록은 유리 커버글라스를 완전히 노출시켜 48% hydrofluoric acid 용액이 들어있는 플라스틱 비이커에 넣어 5~10분간 처리하여 유리 커버글라스를 완전히 제거한 후, 흐르는 물로 충분히 세척하고 상온에서 건조하여 사용하였다. 유리 커버글라스가 제거된 시료 블록은 실체 현미경을 이용하여 관찰하고자 하는 부위를 선정할 후 절삭하여 절편을 제작하였다.