

High Pressure Freezing Method & Applications

(주) 우 명 교 역 / 김 영 곤, 현 진 석

Internet : <http://www.woomyoung.co.kr>

Email : emsales@woomyoung.co.kr

1. High Pressure Freezing Method

전자현미경 검사를 위한 시료의 우수한 동결법은 다양한 Cryopreparation 방법이 있지만 가장 중요한 것은 재현성이다. 동결법은 시료에 함유된 수분(Specimen water)을 미세 결정 (microcrystalline) 또는 무정형(amorphous)의 얼음(ice)을 만들며, 이것을 얻기 위해 시료는 10,000°C/s보다 낮지 않은 동결율에서 가능한 한 빨리 동결되어야 한다. 지금까지의 동결 방법들은 Plunge Freezing, Jet Spray, Cold Block Cryo Fixatoin 등이 상용되었으나, Poor heat conductance of water에 의해 이러한 방법들은 10~20 um사이에서 측정되는 동결시료에만 만족시킬 수 있다. 동결방지제가 시료에서 물의 동결점을 낮추어 얻어졌다면, Tissue sample 과 같은 두꺼운 시료에 대해서 과거에는 오직 동결에서만 가능했다. 화학 동결방지제의 결점은 각기 다른 형태의 artefacts가 세포 구조에 영향을 미친다는 점이다. BAL-TEC AG와 협력 관계인 ETH Zurich의 MOOR교수에 의해 개발된 High Pressure Freezing 방법을 사용함으로써 이러한 artefacts는 제거될 수 있었으며, 이 방법은 물의 동결점을 낮추어 전적으로 물리적인 현상에 기초를 두었으며, 그 기능은 다음과 같다.

- 2,100 Bar에서 물의 융점이 0°C에서 -22°C로 떨어짐.
- 정상대기상태에서 동종 핵형성(homogeneous nucleation)은 -40°C에서 시작된다.
- 높은 압력에서의 이 핵형성은 물이 -90°C에 도달할 때까지 시작하지 않는다.
- 2,100 Bar에서 물은 핵형성과 이에 따른 Crystal growth rate를 급격히 감소시키는 대기압에서보다 점성이 1,500배이다. 이것은 앞에 언급한 방법에 의해 동결을 만족시키기 위해 요구되는 극단적으로 높은 동결율 (최소 10,000°C/s)은 이 High Pressure Freezing 방법에는 필요가 없다는 것을 의미한다.
- High Pressure Freezing 방법은 유리 모양으로 된 부피 약 1mm³, 두께 0.2mm의 시료 또는 추가 동결 방지제가 필요없이 200°C/s의 낮은 동결율에서 적절하게 동결된 두께 0.5mm의 시료가 해당된다.

2. Applications

- Artefact-free freezing of large tissue specimens without requiring structure-altering freeze protective additives.
- Ideally suited for subsequent sample replication by freeze fracturing in a freeze etching system for TEM applications or subsequent cryo sectioning for cryo SEM investigations.
- Best suited in conjunction with subsequent freeze substitution, followed by low temperature embedding and polymerization in conventional ultramicrotomy.
- Suitable for samples destined for subsequent thin sectioning in their frozen state by cryo-ultramicrotome for Cryo-TEM analyses.

For samples subject to subsequent freeze drying in SEM and TEM applications