

배양한 근육모세포의 세포 동결 할단(cell freeze fracture)

한가형[#], 박창현[†], 정혜선[†], 이상훈[#], 김수진[#], 엄창섭^{*}

^{*}고려대학교 의과대학 해부학교실, [#]BK21 의과학사업단, [†]전자현미경실

동결 할단 법은 -150°C이하의 저온에서 세포를 급속히 동결한 후 칼 등을 사용하여 세포를 할단하는 방법으로 replica를 제작하여 gap junction 등 막성단백질의 분포를 비롯한 막구조를 관찰하기 위하여 사용되거나 할단 후 etching의 과정을 거쳐 세포 내의 소기관을 주사전자현미경으로 관찰하는 데 활용되어 왔다. 본 실험에서는 배양 중인 세포를 동결할단하고 Tanaka법을 사용하여 세포질을 etching한 후 주사전자현미경으로 관찰하는 방법의 유용성을 검증하고자 하였다.

실험재료는 흰쥐 뒷다리에서 분리 배양한 근육세포를 사용하였다. 태령 20-21일 흰쥐를 동물실험 규정에 맞게 희생시킨 후 근육모세포를 분리하여 10% FBS와 항생제가 포함된 DMEM으로 배양하였다. 배양 48시간에 trypsin을 사용하여 근육모세포를 분리한 후 gelatin으로 표면처리한 직경 4mm의 수제 coverslip에서 재배양하였다. 배양상태를 위상차현미경으로 관찰하면서 적절한 시점에 고정된 후 동결할단하였다. 고정은 0.1M 인산완충액 혹은 cacodylate 완충액으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4)으로 0, 5, 10, 15, 및 30분 동안 시행하였다. 고정된 조직은 1% osmium tetroxide로 1시간 동안 후고정하였다. 후고정된 조직은 25% DMSO와 50% DMSO를 각각 15분씩 처리한 후 동결제(cryogen)를 사용하여 급속동결 후 liquid nitrogen 속에서 Bal-Tec사의 double replica specimen table을 장착하여 직접 제작한 동결할단장치를 사용하여 freeze fracture를 시행하였다. 할단된 조직은 50% DMSO로 30분간 thawing한 후 다시 1% osmium tetroxide로 1시간 고정하고, 0.1% osmium tetroxide로 48~72시간 동안 etching을 시행하였다. etching된 조직은 전도성 코팅을 시행한 후 탈수하고 t-butyl alcohol로 치환하여 freeze dryer로 건조시킨 후 osmium plasma coating (COPC 60N, Nippon Laser)을 시행하여 S-4700 Hitachi FE SEM으로 15kV의 가속전압 하에서 관찰하였다.

세포의 대부분은 할단되지 않은 상태로 보존되어 있었고, 일부 세포에서만 윗부분이 할단된 상을 보였다. 할단된 부분에서는 mitochondria와 과립세포질세망 등의 세포소기관을 관찰할 수 있었다. 전고정 시간에 따라서는 15분과 30분 고정을 시행한 경우, 할단부위에서 세포내 소기관이 관찰되지 않아 etching이 일어나지 않았음을 알 수 있었고, 10분 고정에서는 약 50%, 5분에서는 비교적 etching이 잘 되어 세포소기관을 관찰할 수 있었다.

조직편을 사용한 freeze fracture는 흔히 사용되는 방법이나 배양 세포에서 freeze

fracture를 시행하는 것은 매우 드물어 국제적으로도 1-2편의 논문만을 접할 수 있는 상황이다. 배양세포를 대상으로 한 freeze fracture를 활용하면 세포간의 융합과 같은 세포간 상호 작용을 직접 관찰할 수 있는 유용한 방법으로 생각된다.

본 연구의 결과는 배양세포를 사용한 cell freeze fracture의 가능성을 보여주는 것이며, 앞으로 배양세포의 동태, 특히 세포간의 상호 작용을 이해하는 데 도움이 될 것으로 생각된다.



Fig. 1. Scanning electron microscopic image of the freeze-fractured cultured primary myoblasts.