

Cell Tomography and Cryo-Electron Microscopy

한성식

고려대학교 생명과학대학

세포의 구조 연구는 여러 종류의 현미경을 통해 이루어져 왔다. 광학현미경이나 형광현미경은 조직이나 세포의 구조를 쉽게 볼 수 있는 방법으로 이용되어 왔으나, 해상도 한계에 의해 세포내 소기관의 구조를 연구하는 데 이용되기는 어렵다. 그에 반해 짧은 파장의 전자빔을 광원으로 하는 투과전자현미경은 세포 내 소기관의 구조를 연구하는 데 충분한 해상도를 제공한다. 그러나 일반적인 투과전자현미경은 100 nm 이하의 매우 얇은 시료만이 관찰 가능하며, 대개 연구하고자 하는 시료의 심도방향의 구조 정보는 상당 부분 소실된다. 또한 투과전자현미경으로부터 얻어지는 영상은 그 두께 내의 시료를 투사해서 얻어지는 영상이므로 이 투사된 2차원의 단면 영상은 구조를 해석함에 있어 오류를 범할 가능성을 준다. 이에 세포 내 소기관들에 대한 구조연구에 있어 3차원 입체 구조의 구현은 세포생물학 연구에 매우 중요하다.

투과전자현미경의 영상으로부터 3차 구조를 구현하는 방법은 구현하고자 하는 시료가 무엇인지에 따라 크게 세포나 세포내 소기관들의 구조를 구하는 방법과 단백질이나 바이러스처럼 생체 내에서 입자로 존재하는 개별의 물질의 구조를 구하는 방법으로 나눌 수 있다.

이 중, 세포와 세포 내 소기관의 3차 구조를 구현하는 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 연속 절편의 3차 구조 구현과 tilt된 영상의 3차 구조 구현이 그것이다. 첫 번째로 연속절편의 3차 구조 구현 방법은 시료를 연속적으로 section함으로써 얻어지는 연속절편을 투과전자현미경으로부터 영상을 얻어내어 그 연속절편 영상들을 이용한다. 투과전자현미경으로부터 획득된 영상들을 쌓아서 각 방향에 맞추어 정렬을 거친 후, 각 절편에서 구현하고자 하는 부분의 구조를 윤곽선으로 그려내어 surface rendering을 통해 3차원적으로 보여주게 된다. 이것은 비교적 크기가 큰 소기관이나 세포의 구조를 구현하는 데 유용하다. 두 번째 방법은 시편을 tilt해서 얻어진 영상을 이용하는 방법으로, 한 시편 내의 3차 구조를 구현하는 방법이다. 일반적으로 한 시료를 -60도에서 +60도까지 1도 내지 2도 간격으로 점차적으로 기울여 투과전자현미경 영상을 획득한다. 이것은 앞의 방법과 마찬가지로 정렬을 거쳐 3차원으로 보여줄 수 있다. 이 방법은 특히 미토콘드리아와 같은 세포 내 소기관들의 미세 구조를 구현하는데 유용하다. 이 방법에서는 관찰되는 시편의 두께가 두꺼울수록 더 많은 심도 방향의 구조 정보를 얻을 수 있다. 따라서 일반적으로 관찰하는 투과전자현미경 시료의 두께인 100 nm 이내 보다 두

꺼운 시료를 이용하여 구조를 구하는 것이 좋다. 투과전자현미경으로 관찰하는 시편의 두께는 투과전자현미경의 가속전압에 의해 결정된다. 가속 전압이 높을수록 더 짧은 파장의 빔을 만들어 냈으므로 보다 두꺼운 시료를 투과할 수 있다. 따라서 더 많은 구조 정보 분석을 위해서는 두꺼운 시료를 투과해서 영상을 얻을 수 있는 초고압투과전자현미경의 이용이 유용하다. Fig. 1은 초고압 전자현미경을 통하여 관찰한 미토콘드리아와의 영상과 이를 cell tomography에 의해 고해상도의 3차원 구조로 재구성한 예이다.

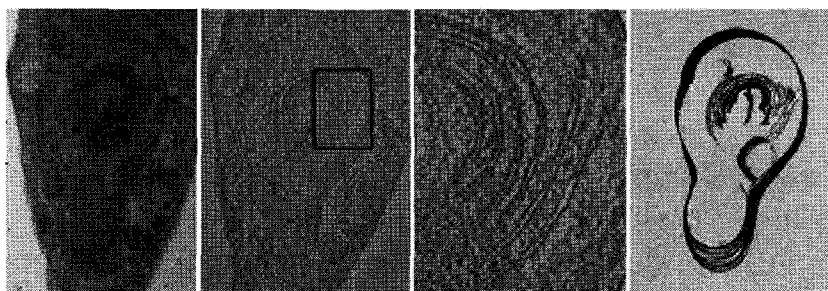


Fig. 1. 미토콘드리아의 초고압 전자현미경 영상과 tomography에 의한 고해상도 3차원 구조 이미지

또한 cryo-TEM의 이용은 수용액 상태에 있는 생물 시료의 구조를 구하는데 있어서 여러 가지 이점을 줄 수 있다. 단백질이나 리포솜 같은 수용액에 분포하고 있는 시료는 cryo-fixation에 의해 고정된 후에 직접적인 관찰을 통해 수용액 내에서의 시료의 구조를 그대로 관찰할 수 있다. Fig. 2에서는 수용액 상에 분포하고 있는 리포솜의 구조를 보여준다. Cryo-TEM로써 수용액상에서 리포솜용액에 포함되는 detergent의 농도가 높아짐에 따라 리포솜의 구조가 깨어지고 있는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3은 막단백질인 CD40를 인위적 세포막 유사체인 리포솜의 막에 끼워넣어, 수용액 상태에서 cryo-TEM으로 관찰함으로써 CD40 단백질의 구조를 확인할 수 있었다. Cryo-TEM을 이용한 이러한 실험들은 나노텍 연구에 있어서 도움을 주는 결과로 이용될 수 있다.

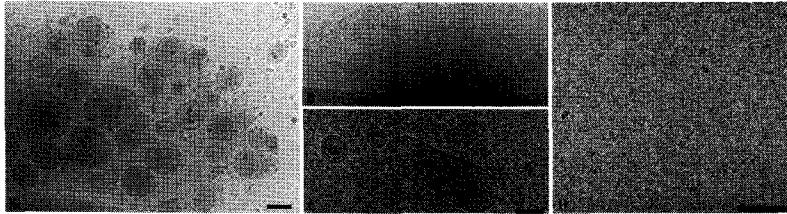


Fig. 2. Cryo-TEM images of liposome. A. liposome, B. Liposome added detergent at 1:3 ratio, C. Removing detergent from B. D. Liposome added detergent at 1:5 ratio.

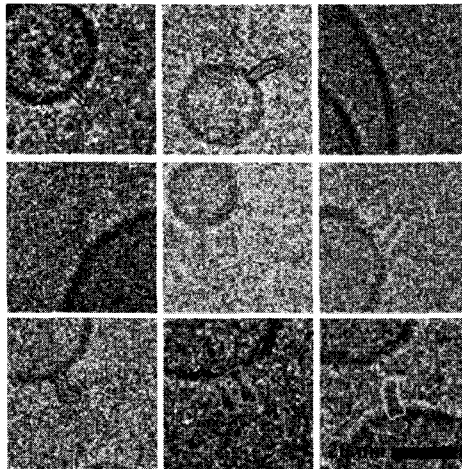


Fig. 3. CD40 incorporated into liposome

참고문헌

- [1] Joachim Frank, Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies, 2nd ed., Oxford University Press, 2006.
- [2] R.A Steinbrecht and K. Zierold, Cryotechniques in biological electron microscopy, Springer-Verag Berlin Heidelberg, 1987.
- [3] Nan Yao and Zhong Lin Wang, Microscopy for nanotechnology, Kulwer Academic Publishers, 2005.