

면역전자현미경적 관찰을 위한 동결초박절편의 미세구조 보존

김연상 · 채희선 · 김경용 · 이원복
중앙대학교 의과대학 해부학교실

Preservation of Ultrastructure of Ultrathin Frozen Sections for Immunoelectron Microscopic Observation

Yun-Sang Kim, Hee-Sun Chae, Kyung-Yong Kim and Won-Bok Lee
Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University
(Received August 31, 1998; revised September 25, 1998)

ABSTRACT

The cryoprotection, section retrieval and embedding methods were studied for the preservation of ultrastructure of ultracryomicrosections in immunoelectron microscopy. The results obtained were as follows.

1. The cryoprotection of ultrastructure with a mixture containing 1.7 M sucrose and 15% polyvinylpyrrolidone was better than that with 2.3 M sucrose. The stretching caused by surface tension and the electron lucent holes decreased more in the cryosections infused with 2.3 M sucrose than in those with the mixture.
2. The difference between section retrieval solutions in cases of cryoprotection with 2.3 M sucrose was that the destructive effects such as electron lucent holes and stretching between myofibrils were less in a mixture containing 1% methylcellulose and 2.3 M sucrose than in 2.3 M sucrose. The difference was obscure in the mixture containing 1.7 M sucrose and 15% PVP, but the destructive effects were slightly less in a mixture containing 1% methylcellulose and 2.3 M sucrose than in 2.3 M sucrose or 1% methylcellulose.
3. The embedding of cryosection on drying with 2% PVA or 2% methylcellulose exhibited some protective effect during observation with transmission electron microscope, but made the ultrastructure more obscure.
4. Mitochondrial membrane and cristae and myofilaments were well delineated in sections infused with 2.3 M sucrose and retrieved with 1% methylcellulose and 2.3 M sucrose.

In summary, it is suggested that the cryoprotection with 2.3 M sucrose and section retrieval with a mixture containing 1% methylcellulose and 2.3 M sucrose are good for the ultrastructure of cryosections.

Key words : Ultrathin frozen sections, Immunoelectron microscopy, Cryosectioning

* 본 논문은 1998년 중앙대학교 교내 학술비 지원에 의한 것임

서 론

항체를 사용하여 항원항체반응이 일어난 장소를 관찰할 수 있게 된 이후, 조직이나 세포에 이러한 면역화학적 염색을 하여 광학현미경 수준에서 다양한 결과를 관찰할 수 있게 되었다(Coon 등, 1941). 이후에 세포의 미세구조의 관찰이 가능한 전자현미경이 나왔고, 이어 철을 함유한 단백질인 페리틴을 표식자로 이용한 면역전자현미경기법이 개발되었고(Singer, 1959) 또한 금을 표식자로 이용할 수 있게 되면서(Felderr와 Marshall, 1962; Faulk와 Taylor, 1971) 세포의 분자구조연구에 커다란 발전이 있어왔다.

그러나 기존의 면역전자현미경에서 사용되는 수지를 포매제로 사용하기 위한 처리과정 즉, 조직내 항원성과 막구조에 해로운 영향을 주는 유기용매의 사용으로 인해 항원성과 항원의 이동과 유출, 막구조 보존에 문제점이 제기되어 왔다. 이 점을 보완한 방법으로 포매제로 수지를 사용하지 않기 때문에 유기용매의 처리과정이 불필요한 동결초박절편(Cristensen, 1971)이 도입되면서 현재 많이 이용되고 있다(Paintner 등, 1973; Glickman 등, 1996; Cordes 등, 1997; Parton 등, 1997; Sodeik 등, 1997).

현재에는 기존의 동결초박절편 원리를 기본으로 하여 조직에 자당(sucrose)을 침투시키는 전고정(prefixed)을 거쳐 동결시키는 방법을 사용하여 면역전자현미경 연구를 위한 항원성과 막구조 보존의 향상을 가져왔다(Tokuyasu, 1973). 그러나 이 방법에는 조직을 지지하는 포매제가 없어 동결조직절편의 구조적 불안정성과 처리과정 중의 조직내 구조변화와 세포내 물질의 방출이 문제가 되고 있다. 조직의 견고성을 높이는 방법으로 침투매개체로 자당과 polyvinylpyrrolidone (PVP)의 혼합액을 사용하는 것도 소개되었다(Tokuyasu, 1989).

동결초박절편의 회수에는 자당방울이 사용되어 왔는데(Tokuyasu, 1973) 포화상태에 가까운 자당이 짧은 시간동안 낮은 온도에서도 액체상태를 유지하며 높은 표면 장력을 갖고 있는 특성을 이용한 것이다. 이 방법으로 절편제작 온도를 더욱 낮출 수 있고

자당의 표면장력으로 조직의 주름짐이나 압축현상을 줄일 수 있으나 절편의 회수시 발생하는 물리적 손상은 계속 문제로 남아 있다(Tokuyasu, 1973; Tokuyasu와 Singer, 1976; Slot과 Geuze, 1983; Tsuji 등, 1992). 그러나 절편회수시 메틸셀룰로오즈(methylcellulose)와 우라닐 아세테이트(uranyl acetate) 혼합물을 사용하여 세포 형태의 보존을 향상시키는 결과를 얻을 수 있다(Griffiths 등, 1984).

동결초박절편은 수세과정 중 쉽게 탈염색되는 경향이 있고 조직이 친수성향을 가진 물질로 포매되었을 경우 수용성 염색용액에 쉽게 염색되어 동결조직을 수지에 포매하는 방법을 사용하여 형태학적 보존의 향상을 가져왔다(Keller 등, 1984). 그러나 수지의 경화(polymerization)에 12시간 이상이 소요되어 면역금표지와 관찰이 24시간 안에는 불가능한 단점을 가지고 있다. 시간적 지연과 일반염색의 단점을 최소화하는 방법으로 adsorption staining이 고안되어, 친수성물질과 낮은 농도의 uranyl acetate의 혼합물을 사용하여 절편의 포매와 염색을 동시에 수행할 수 있게 되었다(Tokuyasu, 1980a, b, 1986; Tokuyasu 등, 1981). 이외에도 polyvinyl alcohol (PVA)과 lead citrate 혼합물을 사용하여 효과적인 결과를 얻을 수 있었다(Tokuyasu, 1989).

지금까지의 여러 연구 역시 동결초박절편을 이용한 면역전자현미경적 연구에 있어서 세포 통합성의 파괴라는 동결조직절편의 한계를 극복하는데 여전히 많은 문제를 남겨 놓고 있다. 이에 본 연구에서는 지금까지의 조직의 미세구조 보존을 위한 방법론적 연구 결과를 재검토하고 가장 적절한 방법을 찾아보고자 하였다.

재료 및 방법

Sprague-Dawley 주의 흰쥐 심장의 오른심실을 적출하여 1 mm³ 이하의 크기로 세절하고 4% paraformaldehyde (0.1 M phosphate buffered saline, PBS)와 0.25% glutaraldehyde (PBS)의 혼합 고정액(4°C, pH 7.4)에 2시간 동안 침적 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 PBS 용액에서 15분 동안 3회 세척한 후, 다음과 같은 여러 종류의 냉동보호액,

절편의 회수액 및 포매제를 사용하여 연구결과를 비교 관찰하였다.

1. 냉동보호 (cryoprotection)

다음의 동결보호액에 각각 조직을 넣고 4°C에서 하룻밤 동결보호처리하였다.

- ① 2.3 M sucrose
- ② 1.7 M sucrose와 15% PVP (mw 20,000 Fluka)의 혼합액

2. 냉동보관

Cryofixation system KF 80 (Leica)으로 -120°C에서 급속냉동시킨 후, 냉동시험관에 넣고, -196°C액체질소에서 절편을 제작할 때까지 냉동 보관하였다.

3. 절편제작

냉동보관 중인 조직을 꺼내 -120°C로 맞춘 cyoultramicrotome (Leica EM FCS)에 장착한 후, 단면의 면적이 0.3×0.5 mm 정도인 직사각형의 형태로 각아낸 후, -120°C에서 절편제작속도를 0.8 mm/sec로 하여 80 nm의 절편을 제작하였다.

4. 절편의 회수

cyoultramicrotome내의 정전기를 제거하면서 제작된 3~5개의 절편은 다음과 같은 3종류의 용액을 각각 루프에 묻혀 회수하였다.

- ① 2.3 M sucrose
- ② 2% methylcellulose (MC)
- ③ 1% methylcellulose와 2.3 M sucrose (MS)

루프에 묻어 있는 용액방울이 동결된 경우 실온에서 녹을 때까지 기다렸다.

다음 과정으로, 루프에 묻어 있는 동결초박절편을 탄소와 포름바가 도포된 nickel 격자에 부착시켜 절편이 있는 쪽이 2% 젤라틴(4°C)에 접하도록 올려 놓고 염색할 때까지 4°C에서 수 시간 동안 보관하였다.

5. 염색

젤라틴에 보관된 동결초박절편을 37°C의 배양기에

서 10분간 처리한 후 다음과 같은 과정을 거쳤다.

- ① 2% uranyl acetate로 30초 염색하여 동결초박절편의 유무 및 보존상태를 확인하였다.
- ② 1% OsO₄, 1분, 1% uranyl acetate 1분, 그리고 1% lead citrate 1분 염색하였다.
- ③ 절편을 2% methylcellulose와 2% PVA (mw 20,00 Sigma)에 각각 10초간 침적하여 포매하여 여분의 포매제를 여과지를 이용해 제거하여 공기중에 건조한 후, 절편의 형태보존이 개선되는가를 확인하였다.

6. 관찰

JEOL 200 CX II 투과전자현미경으로 100 kV 하에서 세포의 미세구조를 관찰하였다.

결 과

1. 동결보호제에 따른 차이

동결초박절편의 제작에서 나타나는 가장 큰 문제점은 절편의 불안정으로 인한 절편의 손상으로, 본 실험에서도 마찬가지로 가장 흔히 나타나는 결점은 공포의 출현이었다. 이러한 공포는 주로 근육원섬유 사이에서 주로 출현하였으며, 또한 사립체 주변에서도 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

1.7 M 자당과 15% PVP의 혼합액으로 동결보호한 경우(그림 4, 5, 6)보다는 2.3 M 자당으로 처리한 경우(그림 1, 2, 3)에서 전반적으로 조직절편의 형태학적 보존상태가 나왔다. 즉 자당으로 처리한 경우 자당과 PVP로 처리한 경우보다 조직절편내의 과도한 공포형성이 크게 감소하였다.

조직절편의 회수시 표면장력에 의해 동결초박절편이 무리하게 확장되는 것은 자당으로 처리한 조직보다는 자당과 PVP로 처리한 조직에서 보다 심하게 일어났다. 자당과 PVP로 처리한 조직에서는 절편의 확장으로 인해 근육원섬유 사이에 조직결손이 생겼고 또한 이러한 부위에서 공포가 다량 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(그림 1, 2, 3, 4, 5, 6).

2. 절편회수용액에 따른 차이

2.3 M 자당으로 동결보호한 조직에서는 그 결과

절편회수용액의 차이에 따른 조직보존상태가 뚜렷하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 2.3 M 자당(그림 1)이나 2% methylcellulose(그림 2)만으로 조직을 회수하였을 때보다 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액(그림 3)으로 조직을 회수하였을 때 나타나는 공포의 수가 현저하게 감소하여 나타났다. 또한 근육원섬유 사이에 나타나는 절편확장에 따른 결손도 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액(그림 3)으로 조직을 회수하였을 때 가장 적게 관찰되었다.

1.7 M 자당과 15% PVP의 혼합액으로 동결보호한 조직에서는 절편회수용액에 따른 차이가 뚜렷하지 않아 보였으나, 대체적으로 보아 2.3 M 자당(그림 4)이나 2% methylcellulose(그림 5)만으로 조직을 회수하였을 때보다 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액(그림 6)으로 조직을 회수하였을 때에 공포의 수가 비교적 적었고 근육원섬유 사이에 나타나는 절편확장에 따른 결손도 적게 관찰되었다.

3. 포매제의 사용에 따른 차이

투과전자현미경 관찰결과, 조직보존상태가 비교적 좋지 않은 1.7 M 자당과 15% PVP의 동결보호제로 조직을 처리한 후, 자당과 methylcellulose의 혼합액으로 절편을 회수하여 대조염색을 하였다. 절편의 최종처리단계인 건조 과정에서, 2% polyvinyl alcohol(그림 7)과 2% methylcellulose(그림 8)로 각각 포매하여 투과전자현미경으로 관찰하는 과정에서 조직절편의 보호 효과는 있었으나, 공포의 감소와 확장에 의한 조직결손상태의 개선은 없는 것으로 관찰되었다. 또한 2.3 M 자당으로 동결보호처리하고, 자당과 methylcellulose로 절편을 회수한 후, 2% methylcellulose와 2% polyvinyl alcohol로 포매한 경우 마찬가지로였으며, 건조과정에서 포매를 한 경우 오히려 미세구조만 더 희미해지는 결과만을 나타내었다.

4. 미세구조

자당과 PVP 모두에서 사립체에서 바깥 및 속 사립체막의 구분이 뚜렷하지 않고 또한 막사이공간도 구분할 수 없었으나, 자당으로 처리한 조직에서는

사립체능선이 뚜렷하게 구분되었으며 절편회수용액이 자당과 methylcellulose인 경우 사립체 능선이 가장 뚜렷하게 관찰되었다(그림 1, 2, 3).

또한 자당으로 동결보호처리한 조직이 자당과 PVP로 처리한 것보다 근육미세섬유가 뚜렷하게 구분되었으며 절편회수용액이 methylcellulose 또는 자당과 methylcellulose인 경우에 가장 뚜렷하였다(그림 1, 2, 3).

고 찰

동결초박절편의 제작 및 면역염색과정은 크게 다섯 단계로 나눌 수 있다. 첫째 단계는 조직처리과정으로 알데하이드고정, 자당주입 그리고 동결과정이다. 둘째 단계는 동결초박절편의 제작이며 셋째 단계는 동결초박절편의 회수이다. 넷째 단계는 면역염색과정이고 마지막 단계는 대조염색, 포매와 건조이다. 본 실험에서는 면역전자현미경적 관찰을 위한 준비과정으로 면역염색과정을 제외한 전 과정에 대한 실험적 관찰을 하여 얻은 결과를 검토하였다.

동결초박절편에 있어서 제일 먼저 접하는 것은 조직고정의 문제로써, 고정은 조직내의 항원성을 유지하면서 동시에 항체가 항원에 접근하기 용이해야 한다. 이와 동시에 절편의 안정성이 유지되어 쉽게 제작되어야 하고, 물리적 성질이 보존되어 형태가 파손되지 않아야 하기 때문에 고정액의 선택이 중요한 문제가 되고 있다. 흔히 사용되는 글루타알데하이드는 절편의 물리적 성질을 보존시켜 형태를 보존시키고, OsO₄나 potassium permanganate보다는 단백질 분자의 형태적 변화를 초래하는 정도가 매우 약하지만(Lenard와 Singer, 1968), 단백질의 항원성을 감소시키거나 소멸시킬 수 있어 면역표지를 불가능하게 한다(Kyte, 1976; Kraehenbuhl 등, 1977). 결국 글루타알데하이드는 비가역적 반응을 일으키는 강력한 고정액이고, 파라포름알데하이드는 2% 이하의 농도에서 2시간 이내로 고정하면 그 반응이 가역적이기 때문에(Griffiths 등, 1984), 고정액의 적절한 농도가 밝혀지지 않은 항원을 표지하고자 할 때에는 대체로 글루타알데하이드 0.1~1%, 파라포름알데하이드 2~4% 범위 내에서 고정액의 농도를 선

택하는 것으로 알려져 있는데 (Polak과 Varndell, 1985), 본 실험에서는 0.25%의 글루타알데하이드와 4% 파라포름알데하이드의 혼합고정액을 사용하였다.

조직내로 동결보호제를 투입하는 것은 동결로 인한 수분의 결빙을 막아 조직의 동결파손을 막고 조직에 성형력을 주어 초박절편을 제작하기 용이하기 위해서이다 (Tokuyasu, 1986). 동결보호제로는 2~2.3 M 자당이 대표적으로 사용되며 (Tokuyasu, 1973) 그 외에도 4~5.5 M 과당이나 polyethylene glycol (mw 300~500)를 사용할 수 있고 (Tokuyasu, 1986), 태아의 조직과 같은 물의 함량이 많은 것은 polyacryamide를 이용할 수 있다 (Tokuyasu, 1983; Tokuyasu 등, 1981). 이외에도 20~30%의 DMSO나 20~60%의 glycerol을 동결보호제로 사용할 수 있지만 자당보다는 결과가 좋지 않다 (Tokuyasu, 1973). 자당은 동결조직의 성형력을 좋게 하고 화학적으로 안정되어 있으며 친수성의 작은 분자량을 가지고 있어, 현재까지 만족할만한 결과를 가져오고 있으며 (Tokuyasu, 1973; Polak과 Varndell, 1985), 2.3 M 자당의 농도가 가장 일반적으로 사용되지만 polyvinylpyrrolidone을 이용한 방법 (Tokuyasu, 1989)이 제시되기도 하였다.

조직의 성형력은 조직의 단백질 함량과 단백질 사이의 화학적 연결에 의해 좌우되어 PVP를 사용할 경우 절편제작이 용이해 진다고 하는데, 이는 일반적으로 조직에서 단백질의 함량은 세포 밖보다 속에 더 많으며 PVP는 주로 세포밖에 존재하여 조직 전체가 균질해지는 효과를 나타내기 때문인 것 (Tokuyasu, 1989)으로 설명되고 있다. 본 실험에서는 조직의 동결보호제로 일반적으로 사용되는 2.3 M의 자당용액과 이 보다 더 나은 동결보호제로 알려진 1.7 M 자당과 15% PVP의 혼합액 (Tokuyasu, 1989)을 각각 사용하여 두 결과를 비교한 결과, 자당과 PVP 혼합액으로 처리한 것 보다 자당만으로 처리한 경우가 공포형성이 감소하는 등, 일반적으로 조직절편의 형태학적 보존이 더 잘되는 것을 알 수 있었다. 또한 조직절편의 회수시 표면장력에 의한 동결초박절편의 무리한 확장이 자당만을 사용한 조직에서 더 적게 일어난다는 것을 본 실험에서 관찰할 수 없었다.

동결초박절편의 제작과정에서 중요한 과정의 하나는 절편의 회수이다. 제작된 동결초박절편을 회수할 때에 루프 끝에 묻힌 방울의 표면장력은 주름진 절편을 편평하게 펴는 데에 중요하지만 과도한 표면장력으로 인해 절편에 손상을 초래할 수 있다는 문제점이 있다.

4°C에서 표면장력은 2.3 M 자당이 가장 크고 (70.8) 물(65.7), 1% methylcellulose와 2.3 M 자당(49.7) 그리고 2% methylcellulose와 2% uranyl acetate (45.7)의 순서로 낮아진다는 보고 (Liou 등, 1996)가 있는데, 자당은 Tokuyasu (1973)가 처음 사용하기 시작하여 2.3 M 자당이 보편적으로 적절한 것으로 알려져 있다. 그러나 표면장력에 의해 절편이 파손되는 결과를 나타내어 젤라틴이나 파라포름알데하이드 (Tokuyasu와 Singer, 1976), 물 (Benichou와 Ryter, 1973), 또는 phosphate buffer 또는 혈청 (Tsujii, 1978, 1981)을 첨가하여 표면장력을 낮추려는 시도들이 있어 왔으나 기대할 만한 효과를 거두지 못하였다.

이러한 문제점을 개선하기 위해 본 실험에서는 2.3 M 자당, 2% methylcellulose, 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액을 각각 이용해 동결초박절편을 회수하여 그 결과를 비교 분석하였다.

자당으로 동결보호한 조직에서는 절편회수용액의 차이에 따른 조직보존상태가 뚜렷하여, 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액으로 조직을 회수하였을 때 나타나는 공포의 수와 근육원섬유 사이에 나타나는 절편확장에 따른 결손이 다른 용액으로 회수하였을 때보다 적었다. 그러나 1.7 M 자당과 15% PVP의 혼합액으로 동결보호한 조직에서는 절편회수용액에 따른 차이가 뚜렷하지 않았으나 다른 용액보다 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액으로 조직을 회수하였을 때 조직손상이 적은 편이었다.

Liou 등 (1996)은 조직동결보호액으로 PVP와 자당의 혼합액을 사용하는 것이 조직절편의 제작이 용이하고 형태보존이 더 잘되는 결과를 나타내었다고 하였으나 본 실험에서는 자당만을 사용한 것이 형태보존에 더욱 좋은 결과를 나타내었다. 즉 PVP와 자당을 동결보호액으로 사용한 경우 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 회수용액이 자당이나 methy-

lcellulose의 회수용액보다 동결조직절편의 형태보존에 가장 효과적이었다. 그러나 이 때의 결과는 자당을 동결보호액으로 사용한 것보다 전체적으로 형태보존이 좋지 않았다. 또한 methylcellulose와 uranyl acetate를 절편회수용액으로 사용하는 경우 형태보존 역시 좋았으나 uranyl acetate로 인해 단백질의 항원성이 떨어지는 결과(Liou 등, 1996)를 초래하므로 사용에 적합하지 않다. 결과적으로 2.3 M 자당을 동결보호액으로 하고 1% methylcellulose와 2.3 M 자당을 절편회수용액으로 사용하는 것이 형태보존에 가장 좋은 방법임을 알 수 있었다.

최종 단계로서 면역염색과 대조염색이 끝나고 건조단계에서 또한 절편의 형태가 파손된다. 이는 건조시 물과 공기 사이에 형성되는 표면장력에 기인한 것으로서(Tokuyasu, 1978), 동결초박절편을 포매제로 덮어 씌워 보호하면 건조로 인한 파손뿐만 아니라 투과전자현미경 관찰시 나타나는 파손 또한 막을 수 있다 취지 하에서 시도되고 있다. Polyvinyl alcohol (Tokuyasu, 1989) 이나 methylcellulose (Griffiths 등, 1984)를 사용하였으나 본 실험에서는 조직절편의 보호효과는 뚜렷하지 않았으며 오히려 미세구조를 흐리게 하는 역효과만 나타났다.

결 론

동결초박절편을 이용한 면역전자현미경 관찰시 미세구조 보존을 위해 동결보호, 절편회수, 최종포매 과정에 여러 방법을 적용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동결보호는 1.7 M 자당과 15% PVP의 혼합액으로 동결보호한 경우보다는 2.3 M 자당으로 처리한 경우에서 전반적으로 조직절편의 형태학적 보존 상태가 나았다. 즉 자당으로 처리한 경우 자당과 PVP로 처리한 경우보다 조직절편내의 과도한 공포형성이 크게 감소하였고, 조직절편의 회수시 표면장력에 의한 동결초박절편의 무리한 확장도 적었다.

2. 2.3 M 자당으로 동결보호한 경우, 절편회수용액의 차이는 2.3 M 자당이나 1% methylcellulose만으로 조직을 회수하였을 때보다 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액으로 조직을 회수하였을

때, 공포와 근육원섬유 사이에 나타나는 절편확장에 따른 손상이 가장 적었다. 1.7 M 자당과 15% PVP의 혼합액으로 동결보호한 조직에서는 절편회수용액에 따른 차이가 뚜렷하지 않았으나 역시 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액으로 조직을 회수하였을 때 공포와 절편의 손상이 적었다.

3. 건조시 초박절편을 2% polyvinyl alcohol과 2% methylcellulose로 각각 포매를 시킨 경우, 투과전자현미경관찰시 절편의 보호효과는 있으나, 미세구조를 희미하게 하였다.

4. 자당으로 동결보호한 조직에서는 사립체능선과 근육미세섬유가 뚜렷하게 구분되었으며 절편회수용액이 자당과 methylcellulose인 경우 가장 뚜렷하였다.

이상의 결과를 요약하면 2.3 M의 자당으로 동결보호처리하고 1% methylcellulose와 2.3 M 자당의 혼합액으로 절편을 회수할 때 미세구조의 손상이 가장 적은 결과를 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

- Benichou JC, Ryter A, 1973. Mise ou point de la technique de coupes a congelation pour les bacteries gram + et gram -, J. Microsc. 17, 223-232
- Christensen AK, 1971. Frozen thin sections of fresh tissue for electronmicroscopy with a description of frozen-hydrated bacteria, J. Cell Biol. 51, 772-804
- Coon AH, Creech HJ, Jones RN, 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, Proc. Soc. Exp. Biol. 47, 200-202
- Cordes VC, Reidenbach S, Rackwitz HR, Franke WW, 1997. Identification of protein p270/Tpr as a constitutive component of the nuclear pore complex-attached intranuclear filament, J. Cell Biol. 136, 515-529
- Faulk WP, Taylor GM, 1971. An immunocolloidal gold method for the electron microscope, Immunochimistry, 8, 1081-1083
- Felderr CM, Marshall JM, 1962. The use of col-

- loidal gold for studies of intracellular exchange in amoeba *choas*, J. Cell Biol. 12, 640-645
- Glickman JN, Mortin PA, Slot JW, Kornfeld SK, Geuze HJ, 1996. The biogenesis of MHC class compartment in human I-cell disease B lymphoblasts, J. Cell Biol. 132, 769-785
- Griffiths G, McDowell A, Back R, Dubochet J, 1984. On the preparation of cryosections for immunocytochemistry, J. Ultrastruct. Res. 89, 65-78
- Keller GA, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ, 1984. An improved procedure for immunoelectron microscopy ultrathin plastic embedding of immunolabeled frozen sections, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81, 5744-5747
- Krahenbuhl JP, Racine L, Jamieson JD, 1977. Immunocytological localization of secretory in bovine pancreatic exocrine cells, J. Cell Biol. 72, 406-423
- Kyte I, 1976. Immunoferritin determination of the distribution of the (Na⁺-K⁺) ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. I. distal segment, J. Cell Biol. 68, 287-303
- Lenard J, Singer SJ, 1968. Alteration of the conformation of proteins in red cell membranes and in solution by fixatives used in electron microscopy, J. Cell Biol. 37, 117-121
- Liou S, Geuze HJ, Slot JW, 1996. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labelling, Histochem. Cell Biol. 106, 41-48
- Painter RG, Tokuyasu KT, Singer SJ, 1973. Immunoferritin localization of intracellular antigens: the use of ultracryotomy to obtain ultrathin sections suitable for direct immunoferritin staining. Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA 70, 1649-1653
- Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E, 1997. Caveolin-s associates with developing T-tubules during muscle differentiation, J. Cell Biol. 136, 137-154
- Polak JM, Varndell LM, 1985. Immunultraacryomicrotomy In Immunolabelling for electron microscopy, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 71-82
- Singer SJ, 1959. Preparation of an electron dense antibody conjugate, Nature 183, 1523-1524
- Slot JW, Geuze HJ, 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry, Eur. J. Cell Biol. 38, 87-93
- Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A, 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus, J. Cell Biol. 136, 1007-1021
- Tokuyasu KT, 1973. A technique for ultramicrotomy of cell suspensions and tissue, J. Cell Biol. 57, 551-565
- Tokuyasu KT, 1978. A study of positive staining of ultrathin frozen sections, J. Ultrastruct. Res. 63, 287-307
- Tokuyasu KT, 1980a. Immunohistochemistry on ultrathin frozen sections, Histochem J. 12, 381-403
- Tokuyasu KT, 1980b. Adsorption staining method for ultrathin sections, Proceedings of the 38th Meeting of EMSA pp. 760-763
- Tokuyasu KT, 1983. Present state of immunocryoultramicrotomy, Histochem. J. 12, 281-403
- Tokuyasu KT, 1986. Application of cryoultramicrotomy to immunohistochemistry, J. Microsc. 143, 139-149
- Tokuyasu KT, 1989. Use of polyvinylpyrrolidone and polyvinyl alcohol for cryoultramicrotomy, Histochem. J. 21, 163-171
- Tokuyasu KT, Singer SJ, 1976. Improved procedures for immunoferritin labelling of ultrathin frozen sections, J. Cell Biol. 71, 894-906
- Tokuyasu KT, Dutton AH, Geiger B, Singer SJ, 1981. Ultrastructure of chicken cardiac muscle as studied by double immunolabeling in electron microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78, 7619-7623
- Tsuji S, 1978. Ultracryotomy of nerve electroplaque synapses for immunocytochemistry, J. Neurocytol. 7, 381-389
- Tsuji S, 1981. Attempted direct visualization of negatively stained amplified immune complex of synaptic acetylcholinesterase using cryoultramicro-

rotomy sections, *Histochemistry* 72, 369-375
Tsuji S, Anglade p, Daudet-Monsac M, Montelica
-Heino, 1992. Cryoultramicrotomy: electrostatic

transfer of dry ultrathin frozen sections on grid
applied to the central nervous system, *Arch.
Histol. Cytol.* 55, 4243-428

FIGURE LEGENDS

- Figs. 1-3.** Electron micrographs of right ventricular muscle of rat hearts. Blocks of heart were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde for 2 hours. Tissue blocks were infused with 2.3 M sucrose. **Fig. 1.** 2.3 M Sucrose pick-up, **Fig. 2.** Methylcellulose pick-up, **Fig. 3.** Methylcellulose-sucrose pick-up. The microfilaments and membranes and cristae of mitochondria are relatively well delineated especially in **Fig. 3.** Bars=1 μ m.
- Figs. 4-6.** Electron micrographs of right ventricular muscle of rat hearts. Blocks of heart were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde for 2 hours. Tissue blocks were infused with 1.7 M sucrose-15% polyvinyl pyrrolidone. **Fig. 4.** 2.3 M Sucrose pick-up, **Fig. 5.** Methylcellulose pick-up, **Fig. 6.** Methylcellulose-sucrose pick-up. The microfilaments and membranes and cristae of mitochondria are poorly delineated. Bars=1 μ m.
- Figs. 7-8.** Electron micrographs of right ventricular muscle of rat hearts. Blocks of heart were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde for 2 hours. Tissue blocks were infused with 1.7 M sucrose-15% polyvinyl pyrrolidone. Ultracryosections were picked-up with methylcellulose-sucrose, **Fig. 7.** Embedded in PVA, **Fig. 8.** Embedded in methylcellulose. The microfilaments and membranes and cristae of mitochondria are more obscure than those in **Figs. 4-6.** Bars=1 μ m.





