

고압전자현미경의 의·생물학 연구 분야에서의 활용

김 현 옥, 김 지 웅, 유 임 주*

고려대학교 의과대학 해부학교실

The High-Voltage Electron Microscopy in
Biomedical Research

Hyun-wook Kim, Jee-woong Kim, Im Joo Rhyu*

Department of Anatomy, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

ABSTRACT Transmission electron microscopy (TEM) provides high resolution images, which are useful in studying ultrastructure of cells and tissues. We have to use very thin section about 60~100 nm thickness due to poor penetration power of the conventional TEM at 100 kV. To overcome this limitation, TEMs using higher accelerating voltage have been developed. TEMs can be categorized into conventional TEM, intermediate TEM, high voltage TEM (HVEM), and ultrahigh voltage TEM according to their accelerating voltage. HVEM using 500~1,000 kV has an enough penetration power to observe thick specimen up to 3~4 μm , which is useful understanding 3 dimensional configuration of the cell and tissue. HVEM was built up in Korea Basic Science Institute (KBSI, Daejeon, Korea) at 2004, maximum accelerating voltage is 1.3 MV in Korea. Many results showed up to the present various fields of science such as medical science, biology, agriculture and so on. Here, we briefly summarize recent biomedical applications of HVEM to provide an insight of HVEM for morphologist.

Key words : High voltage electron microscopy, Three-dimensional reconstruction, Tilting electron tomogram, Stereo paired image

고압전자현미경의 역사

고압전자현미경 개발은 유리칼(glass knife) 등을 이용한 초박절편(thin section) 제작기술이 정립되기 이전에, 상대적으로 두꺼운 시료를 관찰해야만 하는 상황에서 가속전압을 높여 더 좋은 이미지를 얻기 위한 노력에서 시작되었다. 최초로 고압전자현미경을 이용한 생물시료 사진은 1947년 Van Dorsten 등에 의해 논문으로 발표되었다. 그러나 이와

유사한 시기에 초박절편의 제작기술이 확립되어 통상적인 전자현미경적 방법으로 해상력이 높은 결과를 관찰할 수 있게 되었으며, 고압전자현미경을 이용한 연구는 한 동안 활발하게 진행되지 않았다(Glauert, 1974).

1960년경 프랑스 툴루즈(Toulouse)에 설치된 1.5 MV급의 초고압전자현미경은 흥미로운 결과를 보여주지 못하였다(Dupouy 등, 1960). 이후 고압전자현미경을 이용하여 만족스러운 해상력을 얻은 결과물은 1967년 개최된 U.S-Japan Scientific Cooperation Meeting (on high voltage electron microscopy)에서 처음으로 발표되었으며 박절편(semi-thin section) 및 초박절편을 이용하여 세포간 연결구조의 하나인 간극연

접수: 2009년 6월 2일; 수정: 2009년 6월 15일; 승인: 2009년 6월 17일

*교신저자: 유임주

Tel: 02-920-6149, Fax: 02-929-5696, E-mail: irhyu@korea.ac.kr



Fig. 1. High voltage electron microscopy set up in KBSI (Korea Basic Science Institute, Daejeon, Korea) (JEM-ARM 1300S, JEOL; Maximum accelerator voltage: 1.3 MV).

접 (gap junction)을 보다 분명하게 관찰한 결과를 제시하였다(Hama와 Saito, 1977). 상기 연구에서는 금붕어와 기니아 피그를 이용하여 일련의 과정을 거친 시료를 200,000배에서 최고 540,000배까지 관찰하고 동결파단(freeze-fracture) 방식을 이용하여 표면의 입체적 구조도 확인하였다. 이러한 연구성과는 많은 과학자들로 하여금 초고압전자현미경을 흥미로운 형태학분석 도구로 인식시키는 계기가 되었다(Hama, 1989).

초고압전자현미경은 전 세계적으로 미국, 프랑스, 영국 등에 50여 대가 사용되고 있다고 추정되며, 우리나라에는 2004년 한국기초과학지원연구원(KBSI)에 초고압전자현미경(JEM-ARM 1300S, JEOL, Daejeon, Korea)의 설치를 완료하여 활발하게 운영되고 있다(Fig. 1).

외국에서도 초고압투과전자현미경은 국가에서 관리하는 공동장비로 이용되고 있으며, 대표적으로 미국의 경우 국립전자현미경센터에 1980년경 두 대의 초고압전자현미경이 설치되어 사용되고 있다. 가장 활발하게 고압전자현미경을 사용하는 일본에서는 3 MV급의 초고압전자현미경도 운용 중이며, 국가연구소 및 대학연구소에서 다양한 방법으로 활용 중이다.

Table 1. Classification of electron microscope by accelerating voltage

	Accelerating voltage
Ultra High Voltage Electron Microscope	Above 1,000 kV
High Voltage Electron Microscope	500 ~ 1,000 kV
Intermediate Voltage Electron Microscope	200 ~ 500 kV
Conventional Electron Microscope	25 ~ 125 kV

고압전자현미경 소개

전자현미경은 사용되는 가속전압(accelerator voltage)에 따라 분류되며, 일반적인 전자현미경(Conventional Electron Microscopy)은 25 kV에서 125 kV 정도까지의 전압이 이용되고, 생물시료의 경우 대부분의 실험실에서 70 ~ 100 kV 정도의 전압으로 가동되고 있다. 200 ~ 500 kV를 사용하는 중전압의 전자현미경(Intermediate High Voltage Electron Microscopy)은 최근 많은 실험실과 연구기관에 설치되어 있고, 1,000 kV가 넘어서는 초고압전자현미경(High Voltage Electron Microscopy: HVEM)은 대다수가 일본에 설치되어 운용되고 있다(Table 1).

초고압전자현미경은 70 ~ 100 kV 정도의 전압을 이용하는 통상적인 전자현미경과 동일한 구조이나, 대형화 되어있고 조작방법도 유사하다. 1 MV 이상의 가속전압을 이용하는 초고압전자현미경의 이론적인 해상력은 약 0.1 nm이며, 이는 일반적인 전자현미경의 해상력인 0.2 nm보다 높다. 그러나 이는 생물시료 자체의 해상력 한계와 전자빔 등에 의한 방사선 손상에 의하여 구현 불가능한 이론적 해상력일 뿐이다(Taylor와 Glaeser, 1974). 이를 개선하기 위해 시료의 처리방법에 관한 연구와 함께, 3 MV의 가속전압이 구현되는 초고압전자현미경도 이용되고 있다. 일본 오사카 대학에 최초로 3 MV급의 Ultra-HVEM이 설치되었으며, 박테리아와 플라즈몬, 세포소기관, 손상된 신경계 구조분석 등의 연구에 적용되고 있다(Takaoka 등, 2000).

고압전자현미경의 장·단점

일반적인 투과전자현미경에 비하여 상대적으로 높은 가속전압을 이용하는 고압전자현미경은 여러 가지 장점을 지닌다. 첫 번째는 높은 해상력으로, 높은 가속전압이 이용되면 전자빔의 파장은 짧아지게 되며 긴 파장의 전자를 사용하는 경우보다 우수한 해상력을 가지게 된다. 전자파장이 2 ~ 3 μm 두께의 시료를 통과할 때 나타나는 색수차는 아래 그림으로 설명할 수 있으며, 고압전자현미경의 경우 감소된 색수차로 인하여 높은 해상력을 얻을 수 있음을 보여준다(Fig. 2).

두 번째는 우수한 투과력으로 일반적인 광학현미경에 이용되는 3~5 μm 두께의 시료를 전자현미경적 해상력으로 관찰할 수 있다. 이런 높은 투과력을 이용하면 배양한 세포, 혹은 전자현미경에 사용되는 그리드(grid) 위에 배양된 세포를 고정과 탈수 및 건조하여 관찰할 수 있다.

세 번째 장점은 3차원적 정보의 추출이 용이하다는 것이다. 사실 고압전자현미경은 일반적인 전자현미경에 비해 짧은 파장을 사용하기 때문에 투과력이 높고, 시료 전체의 두께 정보가 하나의 이미지 내에 겹쳐 있게 된다. 이러한 정보는 쌍입체상(stereo paired image)을 이용하여 간단하게 입체적인 정보를 획득할 수 있으며, 3차원적인 시료의 정보를 확보할 수 있게 된다. 서로 다른 각도로 구성된 한 쌍의 사진은 간단한 프로그램 작업을 통해 anaglyphic image를 구현할 수 있고(Kim 등, 2007), 제작된 영상은 누구나 쉽게

적청의 입체안경을 통하여 삼차원적 구조를 확인할 수 있다(Fig. 3). 이 쌍입체상은 엄격하게 말하면, 2.5차원의 영상이라 할 수 있지만(Bonnet 등, 1985), 적절히 활용하게 되면 완전한 3차원 영상을 획득할 수 있다. 시료의 각도를 +60°에서 -60°에 이르기 까지 1~2° 간격으로 연속된 영상(serial tilting image)을 획득한 후, 61 또는 121여 장의 사진으로 3차원 영상을 제작하게 되면 입체적인 형태의 재구성과 함께 구조의 분석이 가능하다(Mun 등, 2008; Perkins 등, 2008; Fig. 4). 이러한 전자토크그램(Electron tomogram)의 제작에 사용되는 영상처리 프로그램으로는 인터넷 상에서 무료로 제공되는 IMOD(from Boulder Laboratory for 3-D Electron Microscopy of Cells in Colorado university, <http://bio3d.colorado.edu/imod/>)와 같은 프로그램이 있고, 사용자 편의와 자동화 기능을 첨가한 상용 소프트웨어도 개발되어 있다.

이러한 전자토크그램(Martone 등, 2002) 외에도 연속절편을 이용하여 3차원 재구성을 하는 일반적인 방법도 많이 시행된다. 고압전자현미경을 이용할 경우, 통상적인 전자현미경에 비하여 두꺼운 시료를 사용할 수 있기 때문에 상대적으로 작은 수의 절편을 이용하여 소요되는 시간을 단축하여 미세구조의 3차원 영상을 구현할 수 있다(Igarashi 등, 1988; Lee 등, 2005b).

고압전자현미경의 네 번째 장점은 높은 가속전압을 사용함에도 불구하고 상대적으로 시료의 손상이 적다는 것이다. 이는 짧고 빠른 전자가 시료를 통과하여 상대적으로 시편과 반응하는 전자의 양이 작기 때문이다. 이러한 장점을 응용하여 살아있는 생체시료 관찰에도 사용되었으나, 현재

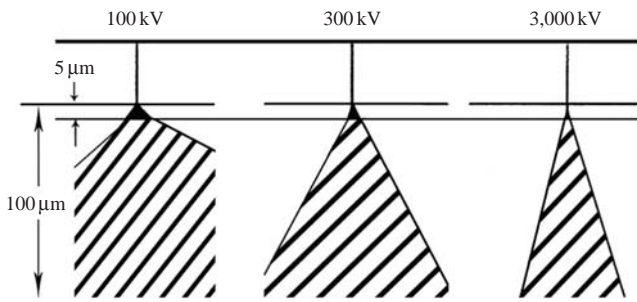


Fig. 2. Simulation of electron scattering for beam energies of 100, 300 and 3,000 kV. The broadening by electron scattering in the 5 μm section is diminished efficiently for 3,000 kV (Modified the original figure of Takaoka *et al.*, 2007).

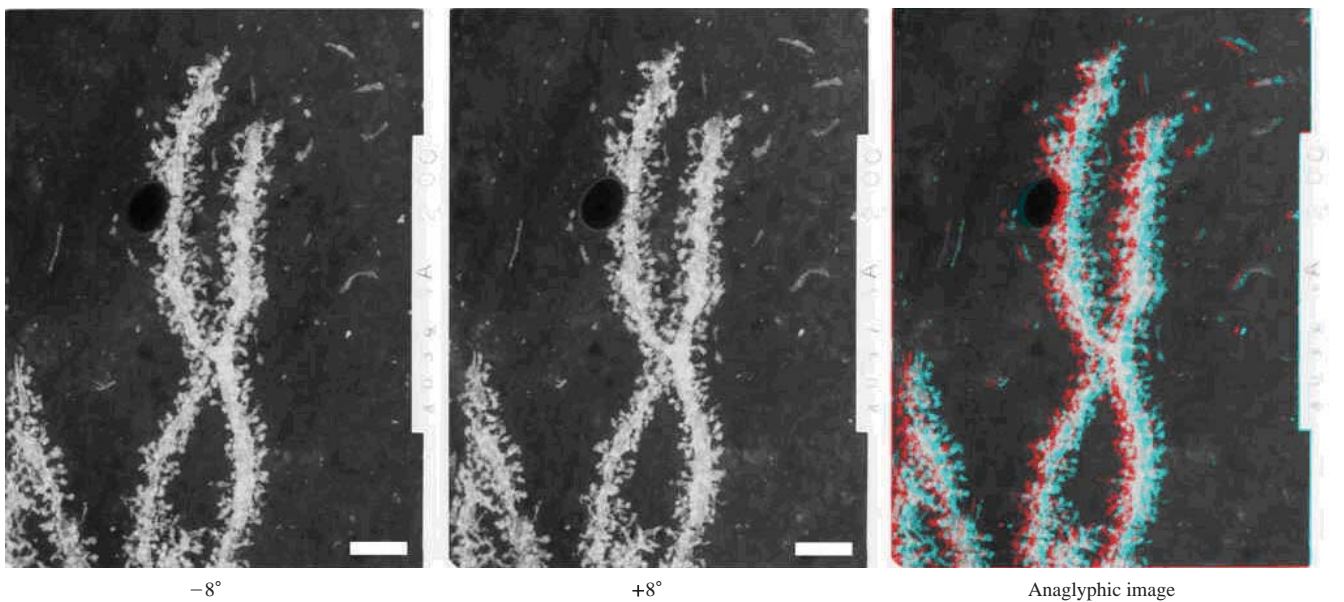


Fig. 3. Comparison of stereo pair image and anaglyphic image. Expert can construct stereo vision in their brain by observing two images (-8° & +8°). Beginners can perceive stereo vision with aid of stereo glasses (blue and red glasses; Kim *et al.*, 2007).

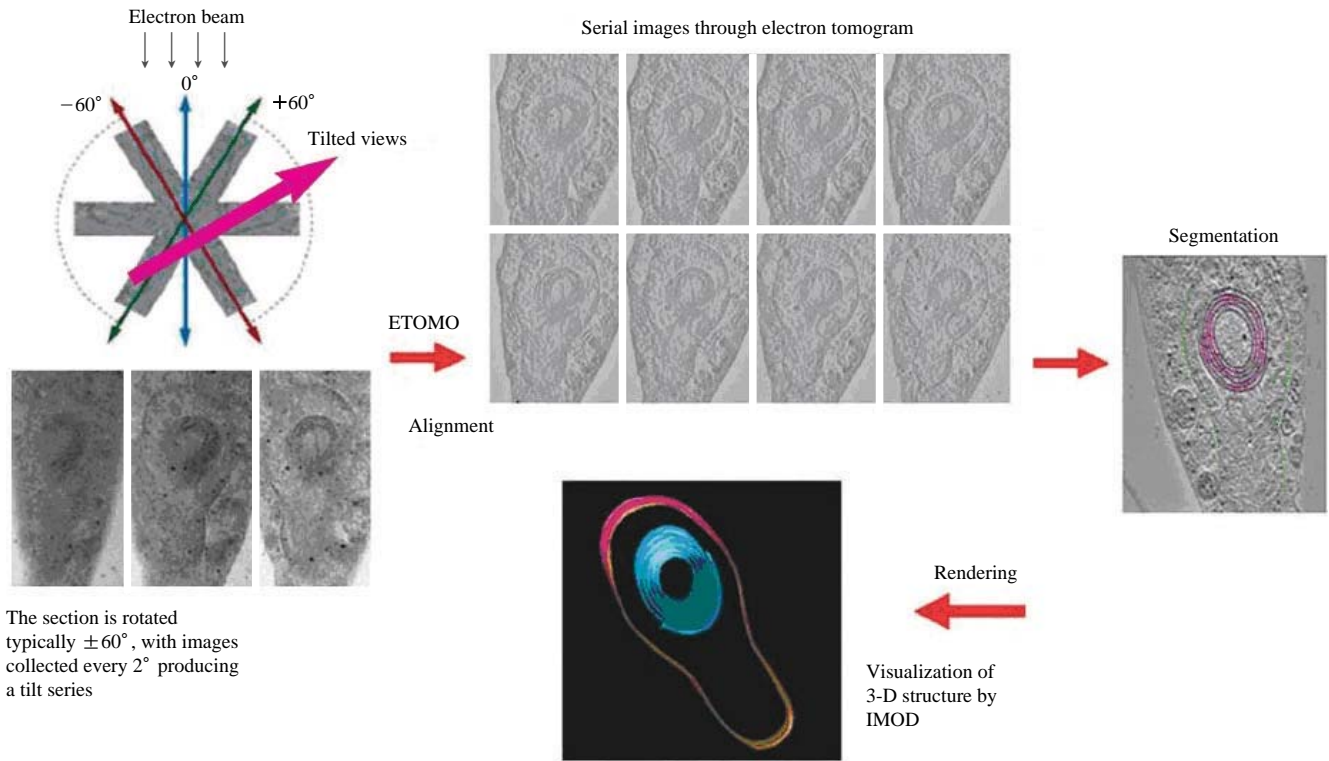


Fig. 4. Example of 3D reconstruction by electron tomography (Mitochondria in muscle cell of *C. elegans*; Mun *et al.*, 2008).

까지는 제한적인 결과가 보고되어 있다. 그러나 향후 시료의 처리방법이나, 기술적인 부분을 보강한다면 충분히 가능하리라 예상된다.

이러한 다양한 장점에도 불구하고, 낮은 콘트라스트는 고압전자현미경이 가지는 가장 큰 단점이다. 전자현미경은 전자가 시료를 투과하는 양에 따라 전자의 밀도가 달라지고 이러한 전자의 밀도차이에 의해서 형성되는 콘트라스트에 의해 구별되는 형태를 분석하기 때문에 고압전자현미경의 낮은 콘트라스트는 반드시 해결해야 할 문제이다. 전자현미경용 시료는 일반적으로 중금속인 uranyl acetate와 lead citrate를 이용한 이중염색방법으로 전자밀도를 높이고, 콘트라스트를 증가시킨다. 뿐만 아니라 phosphotungstic acid 염색법을 이용하여 선택적으로 염색하는 방법도 개발되었다. 가장 보편적으로 사용되는 선택적 염색법은 1965년에 Friend와 Murray에 의해 개발된 osmium impregnation technique이며, 이는 지금도 전자현미경 시료 제작에 보편적으로 사용되고 있다. 이를 이용하여 $7\mu\text{m}$ 두께의 절편이 1 MV의 고압전자현미경에서 관찰되기도 하였다(Rambourg, 1977). 이러한 고압전자현미경의 단점은 다양한 실험적인 방법의 연구개발을 통하여 개선되고 있고, 지속적으로 콘트라스트를 증가시키는 기법이 연구되고 있다. 예를 들어, 60°C 정도의 고온에서 전자염색을 진행하거나(Locke와 Krishnan, 1971), standard lead citrate solution을 개발하기도 하였다

(Venable와 Coggeshall, 1965). 특히, araldite를 이용하여 포매된 블록의 경우 염색약에 detergent를 첨가하여 시간당 $2.5\mu\text{m}$ 정도의 빠른 침투를 유도하였고, 높은 콘트라스트를 얻기도 한다(Carasso 등, 1973). 염색시간이 길어지게 되면 상대적으로 시약의 침전물도 증가하게 되는데 이러한 문제는 낮은 농도의 nitric acid의 처리로 인하여 개선시키는 방법이 연구되기도 하였으며(Favard와 Carasso, 1973), 염색한 시료 위에 carbon coating을 시행하여 콘트라스트를 높이기도 하였다(Hama와 Kamino, 1974).

고압전자현미경 시료 제작법

고압전자현미경에 사용되는 시료는 기본적인 전자현미경 시료 제작법을 크게 벗어나지 않는다(Igarashi 등, 1988). 고압전자현미경을 이용하여 두꺼운 조직을 관찰할 경우 콘트라스트가 약하게 관찰되는데, 이를 증가시키기 위해 적절한 염색을 시도하게 된다. 흔히 en bloc stain이라 불리는 이 방법은 통상적인 전자현미경 시료 제작에도 높은 콘트라스트를 얻고자 시행하는 방법으로, 탈수가 진행되기 전 전자염색에 이용되는 uranyl acetate의 농도를 높여 1시간 정도 염색을 한다. 또는 2% 정도의 uranyl acetate에서 하룻밤 염색을 하여 세포막의 콘트라스트를 증가시키기도 한다. 모든 과

Table 2. Some methods to enhance contrast of specimen

Method	Materials: subcellular organelles
Enzyme histochemistry	Glucose-6-Phosphatase: Endoplasmic reticulum
	Thiamina pyrophosphatase: Golgi apparatus
	Cytochrome oxidase: Mitochondria
	Acid phosphatase: Lysosomes
	DAB reaction: pinocytotic vesicle, peroxisomes
Histochemistry	Zinc iodide osmium: Golgi apparatus
	Periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate : Mucopolysaccharides in secretory granules
Radioautography	³ H-thymidine, ³ H-uridine, ³ H-aminoacid, ³ H-fatty acid

정이 끝나고 제작된 절편에 전자염색을 할 경우에도 통상적인 전자현미경 시료보다 높은 농도에서 긴 시간, 그리고 높은 온도에서 진행하기도 하였다(Carasso 등, 1971; Locke 와 Krishnan, 1971). 고압전자현미경에서 관찰하고자 하는 절편의 두께를 제작하고, 얇은 절편일 경우 통상적인 전자현미경과 동일한 방법으로 관찰하게 되지만, 2 μm 이상의 두꺼운 절편일 경우에는 그리드에서 잘 떨어지기 때문에 double mesh grid를 이용하여 고정하기도 한다.

이미 언급한 전통적인 전자현미경적 염색기법 이외에 신경세포를 관찰하기 위해 사용하는 대표적인 기법이 골지염색(Golgi Impregnation)이다. 뇌조직을 골지염색 한 후, 해마에 피라미드세포(pyramidal cell)의 가지돌기가지(dendritic spine) 및 별아교세포의 형태를 분석하는 데 이용되기도 하였으며(Hama 등, 1994), 소뇌의 조롱박세포 가지돌기 가시의 형태적 특징을 확인하고 분류한 연구에도 이용되었다(Lee 등, 2004). 최근에는 면역염색 및 조직화학기법을 이용하여 관심 있는 구조물을 나노골드입자(nano-gold particle) 등으로 표지하여 관찰하는 방법들도 이용되고 있으며, 특정 구조물 관찰을 위해 관찰하고자 하는 조직이나 세포의 소기관을 면역염색으로 표지한 다음 관찰하기도 한다(Table 2).

뿐만 아니라 투과전자현미경이 아닌 주사전자현미경(Scanning Electron Microscopy: SEM)에서 사용되는 건조방법을 통하여 시료를 제작하기도 한다. 이러한 기법을 응용하여 배양된 세포의 골격과 소기관들을 분석한 연구도 소개되었다. Porter와 Anderson(1982)은 PtK2 세포를 초기에 -182°C에서 얼리고 난 후, -95°C에서 동결건조(freeze dry)를 시행한 시료와, glutaraldehyde(GTA)를 이용한 전고정 및 osmium tetroxide(OsO₄)를 사용하여 후고정을 시행한 뒤 시료를 동결건조 하였다. 뿐만 아니라 동결치환(freeze substitution)으로 시료를 준비하고 임계점건조기(critical point dryer: CPD)를 이용하여 건조시킨 시료, 화학적 전·후고정 이후에 탈수를 거쳐 CPD를 이용하여 건조한 시료를 각각 쌍입체상(stereo paired image)을 통하여 비교 관찰하기도 하였다(Porter와 Anderson, 1982). 고압전자현미경의 높은 투과력

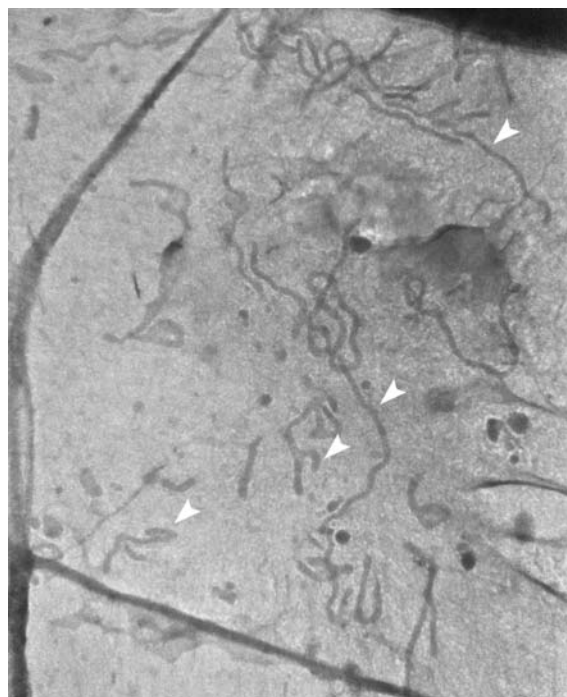


Fig. 5. High voltage electron microscopic image of primary cultured astrocyte. The whole mounted cell could be observed without sectioning and many mitochondria are identified in various shapes of thread (arrow head, original magnification: ×6,000)(Kim et al., The society for Korean Microscopy 37th Conference, 2006).

을 이용하면 초박절편, 혹은 후박절편(thick-section)을 제작하지 않고 세포를 그대로 관찰할 수 있으며, 3차원 구조도 확인할 수 있다(Fig. 5).

고압전자현미경을 이용한 연구 소개

물리학, 재료공학 등의 연구자들은 고압전자현미경을 이용하여 다양한 물질의 구조연구에 앞장섰다. 그러한 재료에 비해서 상대적으로 약한 생물시료들은 강한 전자빔을 견디기 위한 특별한 방법이 필요하였으며, 다양한 접근방식으로 연구가 진행되었다.

앞서 소개한 높은 해상도와 상대적으로 낮은 시료의 손상(beam damage)은 세포의 미세구조 및 거대분자 관찰에 유용하게 사용되었다(Hama와 Nagata, 1970). 1973년에는 Massover 등(1973)에 의해서 ferritin 거대분자에 관한 연구가 발표되기도 하였으며, 난황에 존재하는 수용성 단백질에 관한 연구에도 이용되었다(Hayashi, 1977). 뿐만 아니라 개구리 난자 표면의 세포막에 관한 연구(Massover, 1973), 세포 내 세포질세망, 당단백질, 골지복합체의 미세구조에 관한 연구(Rambourg 등, 1974), 체장 분비물의 결합구조 관찰

(Nagura 등, 1973) 등에 사용되었다. 최근에는 신경성장인자 (nerve growth factor: NGF)의 수용체로 알려져 있는 TrkA (neurotrophin receptor)의 분포를 통상적인 전자현미경과 고압전자현미경을 이용, 전자단층영상을 제작하여 분석한 연구결과가 발표되기도 하였으며 (Nishida 등, 2007), 금 입자를 이용하여 마우스의 큰포식세포에 존재하는 결합부위를 관찰하였다 (Takata 등, 1984).

통상적인 전자현미경보다 높은 투과력은 초고압전자현미경이 가지는 큰 장점이며 이를 이용한 형태의 3차원적 연구도 다양하게 진행되었다. 초고압전자현미경은 상대적으로 두꺼운 시료를 이용, 시료의 각도를 달리하여 투과되는 전자의 밀도가 다른 한 쌍의 사진으로 입체상을 얻을 수 있으며 (쌍입체상: stereo paired image), 또한 -60° 에서 $+60^\circ$ 의 이미지를 연속된 기울기에 따라 촬영한 후 주로 역투사 (back-projection) 방식을 이용하여 복원하게 되는데 이러한 방식을 취하면 3차원 구조를 확인할 수 있다 (Lucić 등, 2005). 1976년에는 이러한 방법을 이용하여 신경세포 축삭 (axon) 내의 무과립세포질세망 (SER) 구조를 3차원으로 재구성 하기도 하였으며 (Tsukita와 Ishikawa, 1976), 이러한 입체구조는 초고압전자현미경뿐만 아니라 통상적인 전자현미경을 이용하여 구현할 수도 있다. 이러한 고압전자현미경을 이용한 3차원적 재구성도 다양한 조직에서 보고되었다 (Lee 등, 2005b). 상대적으로 두꺼운 절편을 이용한 전자단층촬영 (electron tomography: ET)은 얇은 시료를 이용하는 통상적인 전자현미경에 비해서 많은 정보를 포함하고 있다. 흰쥐 심근의 가로세관에 관한 형태구조적 연구가 보고되었으며 (Nakamura 등, 1986), X, Y, Z 축의 조정을 통하여 입체구조 가독성을 높이기 위한 기술적 연구도 진행되었다 (Arii와 Hama, 1987). 연속절편을 이용한 기니아피그의 모용세포의 재구현 (Takasaka와 Shinkawa, 1987) 및 배양된 CHO 세포 관찰과 쥐의 창자, 간, 이자의 관찰 (Nagata, 2001) 등의 연구가 좋은 예이다.

최근 국내에서도 고압전자현미경을 이용하여 신경연접의 3차원적 형태를 재구성하여 발표하였고 (Lee 등, 2005a), 생물학 분야에서는 식물의 엽육세포의 색소체 미세구조를 3차원적으로 분석하여 보고되기도 하였다 (Kim 등, 2006b). 골지염색 등을 이용한 고압전자현미경으로의 접근은 신경세포의 형태적 연구에 많은 도움을 주었다. 초기에는 소뇌 조롱박세포의 가지돌기 및 가지돌기 가지 등에 관한 연구가 많이 진행되었으며 (Palay와 Chan-Palay, 1973), 골지염색과 연속절편을 이용하여, 금붕어의 후각망에 존재하는 ruffed cell을 분석하였으며, 세포의 형태적인 특징을 기술하기도 하였다 (Kosaka와 Hama, 1979). 이어서 ruffed cell은 자세한 구조와 함께 신경연접의 종류에 따른 비교 분석 연구가 발표되었으며 (Kosaka와 Hama, 1980), 이러한 ruffed cell의 신경가지들 3차원 구조로 관찰하여 신경연접에 관한

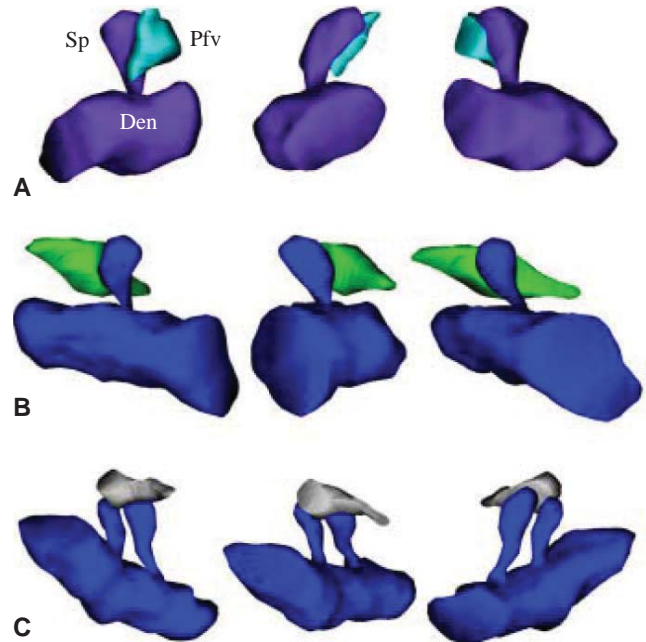


Fig. 6. Practical 3-D reconstruction of the parallel fiber-Purkinje cell synapses (Lee et al., 2005a)

특징을 기술하기도 하였다 (Kosaka와 Hama, 1981). 또한 광학현미경, 전자현미경, 고압전자현미경을 이용하여 mitral cell에 관한 형태 분석 연구도 진행되었으며, 신경연접의 특징에 따라 세가지 종류로 분류한 연구에도 골지염색이 이용되었다 (Kosaka와 Hama, 1982).

고압전자현미경을 이용한 국내의 연구 성과

우리나라는 2004년 대전에 위치한 한국기초과학연구소(KBSI)에 초고압전자현미경이 설치되었으며, 의·생물 분야에서 다양하게 이용되고 있다. 최근에는 nano-particle을 운반하는 liposome에 관한 연구가 진행되었고, 이를 확인하기 위하여 고압전자현미경을 이용하였다 (Park 등, 2006). 초파리를 각각 고압동결법 (high-pressure freezing: HPF)과 동결치환기법 (freeze-substitution: FS)으로 고정하여 250 nm의 두꺼운 절편으로 제작한 후, 초고압전자현미경을 이용하여 tilting image를 얻었다. 이를 통하여 발달중인 광수용체 세포의 세가지 형태가 발견되어 보고되기도 하였다 (Mun 등, 2007). 소뇌 조롱박세포의 가지돌기가지에 관한 형태연구를 위해 각각 250 nm, 500 nm, 1,000 nm의 두꺼운 연속절편을 이용하여 조롱박세포의 가지 및 가지돌기가지를 평행섭유와 함께 3차원 재구성하기도 하였고 (Lee 등, 2005a; Fig. 6), 골지염색으로 표지된 조롱박세포 가지돌기가지를 고압전자현미경으로 분석하여 정상적인 가지돌기가지의 분포



Fig. 7. HVEM images of plastid in plant cell. Six small inclusion bodies scattered throughout a single plastid (Kim, 2006a).

와 학습에 따른 신경가소성을 규명하였다(Lee 등, 2004; Lee 등, 2007).

의학분야뿐만 아니라 식물학에서도 고압전자현미경을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 식물세포의 내부구조를 관찰하고 이를 3차원으로 재구성하기도 하였는데, 이는 통상적인 전자현미경에서 관찰하기 힘든 식물세포 엽록체의 특징적 구조배열을 확인하는 데 활용되었다(Kim, 2006a; Fig. 7). 또한 국제 쌀 연구소에서는 고압전자현미경을 이용하여 벼 내부의 녹말복합체 미세구조를 확인하여, 전분함량이 높은 새로운 품종개발을 위한 연구자료로 이용되기도 하였다(Kim 등, 2005).

결 론

세포나 조직의 3차원적 연구는 보다 자세하고, 사실적인 형태적 구조를 확인하기 위하여 반드시 필요한 연구방법이며 최근에는 다양한 종류의 현미경들이 이용되고 있다. 높은 해상력을 지닌 전자현미경을 비롯하여 투과력이 높은 고압전자현미경을 이용한 전자토포그램기법은 세포소기관의 미세구조에 관한 형태적 분석뿐만 아니라, 거대분자나

바이러스 등의 구조연구에도 활발하게 이용되고 있다. 고압 전자현미경의 높은 해상력과 투과력은 생물시료의 3차원적 구조관찰을 가능하게 하는 장점 중 하나이며, 다양한 실험적 기법들과 사용되어 의·생물 분야의 연구에 응용될 것이다.

요 약

전자현미경(Electron Microscopy)은 우수한 해상력을 제공하여, 조직이나 세포의 미세구조 연구에 다양하게 이용되나, 전자빔 투과력의 한계로 100 nm 전후의 매우 얇은 조직만을 관찰할 수 있는 제한점을 갖는다. 따라서, 좀 더 두꺼운 조직을 관찰하기 위해서 높은 가속전압을 이용하는 현미경이 개발되었다. 전자현미경의 투과력은 사용하는 가속전압에 의해 증가되며, 전압의 크기에 따라 전자현미경(Conventional Electron Microscopy), 중전압현미경(Intermediate Voltage Electron Microscopy), 고압전자현미경(High Voltage Electron Microscopy: HVEM) 및 초고압전자현미경(Ultra High Voltage Electron Microscopy)의 네 가지로 구분된다. 이중 고압전자현미경은 500~1,000 kV의 높은 가속전압에

의해 증가된 투과력을 이용, 통상적인 전자현미경보다 두꺼운 시료를 관찰할 수 있다는 장점과 높은 해상력으로 조직이나 세포의 3차원적 구조 연구에 많이 이용되고 있다.

우리나라는 2004년 초고압전자현미경이 설치되어 운용 중이며, 의생물 분야뿐만 아니라 재료 기술분야에서도 활발하게 이용되고 있다. 이 논문에서는 고압전자현미경에 대한 간단한 설명과 최근 발표된 연구결과를 소개하여 형태학자들의 이해를 돕고자 한다.

찾아보기 낱말 : 초고압전자현미경, 삼차원 재구성, 전자단층 기법, 쌍입체상

참 고 문 헌

- Arii T, Hama K: Method of extracting three-dimensional information from HVTEM stereo images of biological materials. *J Electron Microsc (Tokyo)* 36(4): 177-195, 1987.
- Bonnet N, Quintana C, Favard P, Favard N: Three-dimensional graphical reconstruction from HVEM stereoviews of biological specimens by means of a microcomputer. *Biol Cell* 55(1-2): 125-138, 1985.
- Carasso N, Delaunay MC, Favard P, Lechaire JP: Obtention et coloration de coupes epaisses pour la microscopie electronique a haute tension. *J Microsc (Paris)* 16: 257-268, 1973.
- Carasso N, Ovtracht L, Favard P: Observation, with high voltage electron microscopy, of the Golgi apparatus on sections of 0,5 to 5 microns thick. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 273(10): 876-879, 1971.
- Dupouy G, Perrier F, Durrieu L: The observation of living matter by means of an electron microscope operating under very high voltage. *C R Hebd Seances Acad Sci* 251: 2836-2841, 1960.
- Favard P, Carasso N: The preparation and observation of thick biological sections in the high voltage electron microscope. *J Microsc* 97(1): 59-81, 1973.
- Friend DS, Marray MJ: Osmium impregnation of the Golgi apparatus. *Am J Anat* 117: 135-150, 1965.
- Glauert AM: The high voltage electron microscope in biology. *J Cell Biol* 63(3): 717-748, 1974.
- Hama K: Biological application of high voltage electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 38 Suppl: 156-162, 1989.
- Hama K, Arii T, Kosaka T: Three-dimensional organization of neuronal and glial processes: high voltage electron microscopy. *Microsc Res Tech* 29(5): 357-367, 1994.
- Hama K, Nagata F: High resolution observations of biological sections with a high voltage electron microscope. *J Electron Microsc (Tokyo)* 19(2): 170-175, 1970.
- Hama K, Kamino T: Three-dimensional observation of sensory hairs of the lateral line canal organ of the sea eel using thick serial sections. Proceedings of the 3rd International Congress on High Voltage Electron Microscopy, Oxford, pp. 423-425, 1974.
- Hama K, Saito K: Gap junctions between the supporting cells in some acoustico-vestibular receptors. *J Neurocytol* 6(1): 1-12, 1977.
- Hayashi H: Observations on the octameric molecular arrangement of the protein liquid crystal, newt yolk granules. *J Electron Microsc (Tokyo)* 26 Suppl: 351-354, 1977.
- Igarashi H, Nasu F, Inomata K, Arii T: High-voltage electron microscopy of E-PTA-stained synaptic junctions in the rat frontal cortex. *Brain Res* 473(2): 365-368, 1988.
- Kim IS: High voltage electron microscopy of structure patterns of plastid crystalline bodies in *Sedum rotundifolium*. *Korean J Electron Microsc* 36(2): 73-82, 2006a.
- Kim IS, Park SC, Han SS, Kim ES: Three-dimensional analysis of the mesophyll plastids using ultra high voltage electron microscopy. *Korean J Electron Microsc* 36(3): 217-226, 2006b.
- Kim JW, Lee SJ, Rhyu IJ: Construction of anaglyphic stereo pair image using Adobe Photoshop® program. *Korean J Electron Microsc* 37(2): 143-146, 2007.
- Kim JW, Segal M, Rhyu IJ: Investigation of cultured hippocampal neuron with high voltage electron microscopy. Korean J Electron Microsc 37th Conference, 2006.
- Kim KS, Hwang HG, Kang HJ, Hwang IK, Lee YT, Choi HC: Ultrastructure of individual and compound starch granules in isolation preparation from a high-quality, low-amylose rice, ilpumbyeo, and its mutant, G2, a high-dietary fiber, high-amylose rice. *J Agric Food Chem* 53(22): 8745-8751, 2005.
- Kosaka T, Hama K: Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*) I. Golgi impregnation and serial thin sectioning studies. *J Comp Neurol* 186(3): 301-319, 1979.
- Kosaka T, Hama K: Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*) II. Fine structure of the ruffed cell. *J Comp Neurol* 193(1): 119-145, 1980.
- Kosaka T, Hama K: Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). III. Three-dimensional structure of the ruffed cell dendrite. *J Comp Neurol* 201(4): 571-587, 1981.
- Kosaka T, Hama K: Structure of the mitral cell in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Neurol* 212(4): 365-384, 1982.
- Lee KJ, Jung JG, Arii T, Imoto K, Rhyu IJ: Morphological changes in dendritic spines of Purkinje cells associated with motor learning. *Neurobiol Learn Mem* 88(4): 445-450, 2007.
- Lee KJ, Kim H, Kim TS, Park SH, Rhyu IJ: Morphological analysis of spine shapes of Purkinje cell dendrites in the rat cerebellum using high-voltage electron microscopy. *Neurosci Lett* 359(1-2): 21-24, 2004.
- Lee KJ, Kweon HS, Kang JS, Rhyu IJ: 3-dimensional reconstruction of parallel fiber-purkinje cell synapses using high-voltage electron microscopy. *Korean J Electron Microsc* 35(1): 31-39, 2005a.
- Lee KJ, Park CH, Rhyu IJ: Efficient three-dimensional reconstruction of synapse with high-voltage electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 54(2): 139-141, 2005b.

- Locke M, Krishnan N: Hot alcoholic phosphotungstic acid and uranyl acetate as routine stains for thick and thin sections. *J Cell Biol* 50(2): 550-557, 1971.
- Lucić V, Förster F, Baumeister W: Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem* 74: 833-865, 2005
- Martone ME, Gupta A, Wong M, Qian X, Sosinsky G, Ludascher B, Ellisman MH: A cell-centered database for electron tomographic data. *J Struct Biol* 138(1-2): 145-155, 2002.
- Massover WH: Complex surface invaginations in frog oocytes. *J Cell Biol* 58: 485-491, 1973.
- Massover WH, Lacaze JC, Durrieu L: The ultrastructure of ferritin macromolecules. I. Ultrahigh voltage electron microscopy (1-3 MeV). *J Ultrastruct Res* 43(5): 460-475, 1973.
- Mun JY, Arii T, Hama K, Han SS: Rhabdomere formation in late pupal stage of *Drosophila melanogaster*; observation using high-pressure freezing and freeze-substitution, and high-voltage electron microscopy. *Korean J Electron Microsc* 37(1): 35-42, 2007.
- Mun JY, Lee KE, Han SS: Techniques for cryo-electron tomography in biological field. *Korean J Electron Microsc* 38(2): 73-79, 2008.
- Nagata T: Three-dimensional high voltage electron microscopy of thick biological specimens. *Micron* 32(4): 387-404, 2001.
- Nagura H, Asai J, Noda A, Hayakawa T, Nakajima S: Ultramicro-morphological study of pancreatic fibrosis using the pancreatic biopsy material. *Nippon Rinsho* 31(11): 3277-3285, 1973.
- Nakamura S, Asai J, Hama K: The transverse tubular system of rat myocardium: its morphology and morphometry in the developing and adult animal. *Anat Embryol (Berl)* 173(3): 307-315, 1986.
- Nishida T, Nishikawa Y, Jinnai H, Arii T, Yoshimura R, Endo Y: Ultrastructural localization of the neurotrophin receptor (TrkA) in cultured rat pheochromocytoma PC12 Cells: three-dimensional image analysis by high voltage electron microscopy. *Biomed Res* 28(3): 161-167, 2007.
- Palay SL, Chan-Palay V: High voltage electron microscopy of the central nervous system in Golgi preparations. *J Microsc* 97(1): 41-47, 1973.
- Park SH, Oh SG, Mun JY, Han SS: Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. *Colloids Surf B Biointerfaces* 48(2): 112-118, 2006.
- Perkins GA, Sosinsky GE, Ghassemzadeh S, Perez A, Jones Y, Ellisman MH: Electron tomographic analysis of cytoskeletal cross-bridges in the paranodal region of the node of Ranvier in peripheral nerves. *J Struct Biol* 161(3): 469-480, 2008.
- Porter KR, Anderson KL: The structure of the cytoplasmic matrix preserved by freeze-drying and freeze-substitution. *Eur J Cell Biol* 29(1): 83-96, 1982.
- Rambourg A: Three dimensional configuration of cell organelles. *J Electron Microsc (Tokyo)* 26 Suppl: 327-331, 1977.
- Rambourg A, Clermont Y, Marraud A: Three-dimensional structure of the osmium-impregnated Golgi apparatus as seen in the high voltage electron microscope. *Am J Anat* 140(1): 27-45, 1974.
- Takaoka A, Hasegawa T, Yoshida K, Mori H: Microscopic tomography with ultra-HVEM and applications. *Ultramicroscopy* 108(3): 230-238, 2007.
- Takaoka A, Yoshida K, Mori H, Hayashi S, Young SJ, Ellisman MH: International telemicroscopy with a 3 MV ultrahigh voltage electron microscope. *Ultramicroscopy* 83(1-2): 93-101, 2000.
- Takasaka T, Shinkawa H: Serial section reconstruction of the guinea pig outer hair cells as studied with a high-voltage electron microscope and a computer-graphic display. *Acta Otolaryngol Suppl* 435: 7-20, 1987.
- Takata K, Hirano H: Whole-cell-mount cytochemistry by the colloidal gold labeling method. Combined transmission and scanning electron microscopic study of ConA binding sites in mouse macrophages. *Histochemistry* 81(5): 435-439, 1984.
- Taylor KA, Glaeser RM: Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science* 186(4168): 1036-1037, 1974.
- Tsukita S, Ishikawa H: Three-dimensional distribution of smooth endoplasmic reticulum in myelinated axons. *J Electron Microsc (Tokyo)* 25(3): 141-149, 1976
- Van D, AC, Oosterkamp WJ, Lepoole JB: An experimental electron microscope for 400 kilovolts. *Philips Technical Rev* 9: 193-201, 1947.
- Venable JH, Coggeshall R: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 25: 407-408, 1965.



KOREAN ASSOCIATION OF
ANATOMISTS