

# Whole Mount Preparation of Primary Cultured Neuron for HVEM Observation

Hyun-wook Kim, Soontaek Hong, Seunghak Oh<sup>1</sup>,  
Chang hyun Park<sup>1</sup>, Hyun Kim, Im Joo Rhyu\*

Department of Anatomy, College of Medicine,  
Korea University, Seoul 136-705, Korea

<sup>1</sup>Medical Science Research Center, College of Medicine,  
Korea University, Seoul 136-705, Korea

(Received March 2, 2011; Revised March 25, 2011;

Accepted March 25, 2011)

**ABSTRACT** : High-voltage electron microscope (HVEM) has higher resolution and penetration power than conventional transmission electron microscope that could be load thick specimen. Some researchers have taken this advantage of HVEM to explore 3-dimensional configuration of the biological structures including tissue and cells. Whole mount preparations has been employed to study some cell lines and primary culture cells. In this study, we would like to introduce useful whole mount preparation method for neuronal studies.

The plastic coverslips were punched, covered by formvar membrane and coated with carbon. The neurons obtained embryonic 18 rat hippocampus were seeded on the prepared cover slip. The coverslips were fixed, dried in freeze drier and kept in a desiccator until HVEM observation.

We could observe detailed neuronal structures such as soma, dendrite and spine under HVEM without conventional thin section and heavy metal stain. The anaglyphic image based on stereo paired image ( $-8^\circ$ ,  $+8^\circ$ ) provides three dimensional perception of the neuronal dendrites and their spines.

This method could be applied to sophisticated analysis of dendritic spine under the various experimental conditions. (김현욱, 홍순택, 오승학, 박창현, 김 현, 류임주: 배양된 신경세포 관찰을 위한 초고압전자현미경 홀마운트 시료제작기법)

**Keywords** : HVEM, Whole mount preparation, Primary neuron, Stereo pair image

전자현미경을 이용한 형태학적 연구는 1931년 Max Knoll과 Ernst Ruska의 TEM 발명 이후 지금까지 다양한 방법으로 진행되고 있다(Ruska, 1986). 시료를 고정 및 탈수과정을

거쳐 포매를 한 플라스틱 블록을 이용하여 얇은 절편을 관찰하는 가장 기본적인 방법에서부터 두꺼운 시료를 관찰할 수 있는 초고압투과전자현미경, 그리고 시료를 동결하여 화학적 고정 등의 과정에 의한 형태적 변화를 가장 줄인 Cryo-TEM의 이용까지 개발되어 있다(Mun et al., 2008). 이러한 방법들은 다양한 세포소기관의 자세한 구조를 확인할 수 있게 하였으며 구조적 특징을 바탕으로 이후 기능적 연구를 수행할 수 있는 기본 정보가 되었다.

초고압투과전자현미경은 초박절편을 제작할 수 있는 기술력이 낮았던 과거에 좀 더 두꺼운 시료를 효과적으로 관찰하고자 개발되었으며 최근에는 두꺼운 시료를 투과할 수 있다는 장점을 이용하여 미세구조의 3차원적 재구성에 다양하게 활용되고 있다(Lee et al., 2005). 통상적인 전자현미경보다 상대적으로 두꺼운 시료는 더 많은 정보를 포함하고 있으며 보다 다양한 구조적 특징을 관찰할 수 있게 되었다.

초고압투과전자현미경(HVEM)은 1 MV 이상의 가속전압을 이용하여 전자빔을 조사하는 투과전자현미경(TEM)의 한 형태로 상대적으로 짧고 빠른 파장이 시료를 통과하기 때문에 시료의 손상이 적어 의생물 분야에서 다양하게 활용되고 있다(Kim et al., 2009a). 특히, 통상적인 100 kV 미만의 가속전압을 이용하는 전자현미경에 비해 높은 투과력과 해상력을 가지는 특징을 활용하여 3~5  $\mu\text{m}$  두께의 두꺼운 시료의 관찰과 함께 미세구조의 3차원 재구성에 활발하게 이용되고 있다(Hama et al., 1994; Lee et al., 2004; Lee et al., 2005; Lee et al., 2007). 이러한 장점에 기반하여, 배양된 세포를 물리적으로 절편을 하지 않고 관찰하는 whole mount preparation 기법이 활용되어 왔다. 통상 세포를 독성이 적은 황금그리드(gold grid)에 폼바막(formvar membrane)을 코팅하여 지지막을 형성한 후 충분히 배양하고 통상적인 주사전자현미경(SEM) 시료제작 방법인 고정 및 탈수과정과 건조 과정을 거쳐 관찰한다. 이와 같은 방법으로 관찰된 세포는 핵, 미토콘드리아, 리포푸신 과립, 용해소체 등을 관찰할 수 있으며 높은 해상력을 바탕으로 형태의 계측 및 분석이 가능하다(Goldstein et al., 1984). 뿐만 아니라 바이러스에 감염된 세포를 위와 같은 방법으로 처리하여 주사전자현미경으로

이 논문은 한국연구재단의 국제공동연구사업의 지원에 의한 것임(2005-10909)

\* Correspondence should be addressed to Im Joo Rhyu, Department of Anatomy, College of Medicine, Korea University, 126-1 Anam Dong, Seongbuk Gu, Seoul 136-705, Korea. Ph.: (02) 920-6381, Fax: (02) 929-5696, E-mail: irhyu@korea.ac.kr

관찰한 부분을 초고압투과전자현미경에서 확인하고 비교하는 연구도 진행되었으며 (Yoshida et al., 1986), PC12 cell을 이용하여 neurotrophin 수용체의 위치를 확인하고 3차원적 재구성을 시행한 연구도 보고되었다 (Nishida et al., 2007).

Aizu 등은 Thermanox<sup>®</sup> plastic coverslip에 그리드의 직경과 같은 3 mm의 정교한 구멍을 뚫은 후, 포름바막을 두겹게 코팅하여 상단에 세포를 배양하고, 배양이 끝난 세포는 위와 동일한 방법으로 시료를 처리하고 그리드시멘트로 접착성을 높인 구리그리드를 이용하여 포름바막과 함께 배양된 세포를 떼 올리는 방법을 제안하였다 (Aizu et al., 1981). 이와 같은 방법을 이용하게 되면 상대적으로 가격이 높은 황금그리드의 사용을 배제할 수 있다 하겠다.

상기 실험 방법들은 그 접근이 용이하고, 세포배양 시스템이 갖춰진 곳에서 간편하게 시행할 수 있는 방법이며, 광학현미경 수준에서 주로 관찰 가능한 두꺼운 시료를 전자현미경의 해상력으로 확인할 수 있기 때문에 세포의 내부 및 외부형태와 그 구조물들의 보다 자세한 형태적 특징이나 정량적 분석 등이 가능하다. 따라서 이 연구에서는 Aizu 등의 방법을 응용하여 일차배양 된 신경세포를 배양하여 관찰하는 방법 및 간략한 예비 결과를 보여주고자 한다 (Aizu et al., 1981).

이 연구에 사용된 신경세포는 임신 18일된 흰쥐 (Sprague-Dawley) 태자의 해마로부터 적출하였다. 일반적인 일차 신경세포 배양 방식으로 진행하였으며 적절하게 준비된 신경세포는 Thermanox plastic coverslip (TPC)에 약  $3 \times 10^3$  개씩 깔아 주었다 (Kim et al., 2009b). 신경세포를 깔아준 Thermanox plastic coverslip (Cat. #174950, NUNC, USA)은 다음과 같은 방법으로 제작되었다. 준비된 13 mm TPC는 직경 3 mm의 날이 부착된 천공기 (Filepecker-I, SPC, Korea)를 이용하여 4~5 개의 구멍을 뚫은 후, 1~3% 농도의 포름바 (Cat. #15800, EMS, USA) 용액을 이용하여 코팅을 시행하였다. 이 때 천공기의 특성이 매우 중요하며, 단순하게 망치 등을 이용한 천공의 경우 그 면이 매끄럽지 않고, 뒤틀림 등이 나타나 포름바막의 코팅이 안정적이지 못하다. 코팅이 완료된 TPC는 충분히 건조한 후 탄소코팅을 시행 하였으며 자외선을 이용하여 15분간 살균한 후 신경세포가 안정적으로 배양될 수 있는 poly-D lysine을 이용하여 24시간 코팅하였다. 충분히 세포가 배양된 TPC는 배양액을 제거한 후 37°C로 데워둔 0.1 M sodium cacodylate buffer (No. 18851, TED PELLA, USA)를 이용하여 30초간 2회 수세한 후 2.5% glutaraldehyde (Cat. #16310, EMS, USA) in 0.1 M sodium cacodylate buffer를 이용하여 30분간 상온에서 전고정하였다. 고정이 완료된 세포는 동일 완충용액을 이용하여 5분간 3회 수세한 후 1% osmium tetroxide를 이용하여 15분간 후고정을 진행한 후 30% ethanol로 30분간 수세하였다. 수세가 완료된 세포는 0.2%의 uranyl acetate (Cat. #22400, EMS, USA)

in 30% ethanol을 이용하여 15분간 en-bloc stain을 진행한 후 농도상승 순의 ethanol에 의한 탈수를 시행하였다 (30% → 40% → ... → 90% → 95%, 각 10분 100%, 20분 3회). 탈수가 완료된 시료는 동결건조기 (freeze dryer)를 이용하여 충분히 건조하였으며 건조가 완료된 시료는 0.3% biodegradable meshcement 로 코팅한 one-hole cooper grid (Cat. #G2010-Cu, EMS), 혹은 100 mesh cooper grid (Cat. #G100-Cu)를 이용하여 포름바막과 건조가 완료된 세포를 함께 떼올렸다. 모든 과정이 종료된 그리드는 제습함에서 1시간 이상 충분히 보관한 후 초고압투과전자현미경을 이용하여 관찰하였다 (Fig. 1) (H-1250M, Hitachi, Japan). 뿐만 아니라, 시료대를 회전하여 각각  $-8^\circ$  와,  $+8^\circ$ 에서 촬영한 쌍입체상 (stereo pair images)은 Anamaker<sup>®</sup> software를 이용하여 적정입체사진 (anaglyph image)을 제작하였다 (Takashi Sekitani, <http://www.stereoeye.jp>).

Whole mount preparation 기법을 이용하여 일차배양된 신경세포를 관찰한 결과 일반적인 신경세포의 특징인 가지돌기 (dendrite)와 함께 가지돌기가시 (dendritic spine)의 구조를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2a, b). 일반적인 전자현미경 시료보다 상대적으로 두꺼운 구조물인데도 불구하고 전자밀도의 차이가 구분되어 가지돌기와 가지돌기가시의 구분이 비교적 용이하였으며 높은 해상력과 선예도 (sharpness)에 의해 구조물의 구조와 크기를 정확하게 확인할 수 있었다. 본 연구 기법은 그 과정의 특징상 일반적인 전자현미경용 시료에 적용되는 절편 제작 후의 이중염색 과정을 생략하였으나 en-bloc stain만으로도 구조물을 비교 분석할 수 있는 충분한 콘트라스트를 확인할 수 있었다. 높은 투과력을 바탕으로 두꺼운 시료의 내부 구조도 일부 확인할 수 있었으며, 시료대의 회전을 시행하여 획득한 쌍입체상과 재구성한 적정입체사진에서는 두꺼운 시료가 이용되어 좀 더 입체감 있는 결과를 도출할 수 있었으며 고배율에서 시료대의 회전에도 충분히 포름바막과 배양된 신경세포가 견뎌내는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2c, d). 통상적인 형광표지법 등의 방법을 이용하여 공초점 레이저 주사현미경 (confocal laser scanning microscope)을 이용할 경우 가지돌기와 가지돌기가시의 전체적 형태를 확인할 수 있으나 형광발현의 양과 현미경에서 신호처리 방식에 따라 구조물의 크기가 변할 수 있어 정확한 구조물의 크기를 측정하는데 한계가 있다. 일반적인 TEM의 경우에는 70~100 nm의 얇은 절편을 이용하기 때문에 주어진 한 장의 절편에서 가지돌기 가시의 목을 검색하는데 많은 시간이 걸리고, 3차원적인 정보를 얻기 위해서는 인접한 절편을 참고하여야 하는 불편함이 있다. 그러나 이 연구방법에 의한 결과에서는 가지돌기 가시의 목의 크기와 3차원적 구조를 명확하게 확인할 수 있었다 (arrow head).

본 연구에서는 이러한 장점을 지닌 초고압투과전자현미경을 이용하여 일차배양된 신경세포의 형태를 whole mount

preparation을 이용하여 절편제작 없이 그대로 관찰하였다. 두껍게 제작된 포르뮬바막은 2주 이상의 신경세포 배양기간 동안 손상 없이 세포를 안정적으로 성장하게 하였으며 전고정 및 후고정 이후 알코올을 이용한 탈수과정 및 건조과정에서도 지지막이 안정적으로 유지 되었다. 세포배양을 위하여 자외선을 이용하여 15분간 살균이 요구되는데 이 때 시간이 길어지게 되면 세포배양 과정 혹은 실험 과정에서 포르뮬바막이 쉽게 손상됨을 알 수 있었다. 자외선 파장에 의해 얇은 플라스틱 재질의 지지막이 손상을 받는 것이라 생각되며 사용하는 자외선 램프에 따른 적절한 시간 조정이 요구된다.

탄소코팅을 시행하여 지지력을 높인 포르뮬바막은 초고압 투과전자현미경의 높은 전자빔을 안정적으로 수렴하였으며 쌍입체상을 얻기 위한 시료대의 회전도 용이하게 진행할 수 있었다. 뿐만 아니라 예비적으로 실험한 전자토포그램 (electron tomography)을 위한 완전한 회전 ( $-60^{\circ} \sim +60^{\circ}$ ,  $2^{\circ}$  씩 증가) 촬영에서도 포르뮬바막의 손상 없이 모든 이미지를 획득할 수 있었다. 그러나 이러한 촬영을 시도할 경우에는 one-hole 그리드에 비해 mesh 그리드가 좀 더 안정적으로 포르뮬바막을 지지하기 때문에 이를 이용하는 것이 더 좋을 것으로 생각된다.

전자현미경을 이용하여 배양된 세포를 통째로 관찰하는 연구는 다양하게 시도되었다. 대부분의 실험은 세포에 독성이 작은 황금그리드를 이용하여 세포배양을 진행 하였다 (Nishida et al., 2007). 포르뮬바막을 이용하여 코팅한 황금그리드는 세포를 안정적으로 배양할 수 있었으나 구리그리드에 비해 가격이 비쌌 뿐만 아니라 신경세포와 같은 형태의 세포는 그리드의 격자면을 따라 성장하는 경향이 있기 때문에 세포의 일부분이 가려지므로 전체 형태를 관찰할 수 없다는 단점이 있다. 또한 직경 3 mm의 작은 그리드에는 원하는 양의 세포를 정확하게 seeding할 수 없다. Aizu 등이 고안한 방법은 일반적으로 세포배양에 이용되는 coverslip과 동일한 크기이나 그 재질이 플라스틱으로 이루어져 있고, 개조가 용이하였던 Thermanox plastic coverslip을 이용하여 통상적인 세포배양법과 크게 다르지 않은 방법으로 실험을 진행할 수 있다는 장점이 있다. 뿐만 아니라 현미경에서 관찰하기에 적절한 개수의 세포를 뿌리는 것도 가능하다. 여기서 가장 중요한 부분은 깔끔하게 그리드의 직경과 동일한 구멍을 만드는 것인데 본 연구에서는 특수한 천공기를 이용 하였다. 천공기는 원형의 모든 날에 균일하게 힘이 전달될 수 있는 기계장치이며 덕분에  $360^{\circ}$  원형의 구멍을 뒤틀림 없이 제작할 수 있었다. 뒤틀어지지 않은 구멍은 포르뮬바막을 씌울 수 있는데 매우 중요한 요소이다.

앞서 설명한 방법과 같이 일차배양된 신경세포를 관찰하였다. 상기 연구 방법은 그 배양이 까다로운 신경세포를 안정적으로 관찰하였으며 사전 연구에서는 대표적으로 많이 이용되는 세포주 (cell line)인 HeLa cell, COS7 cell 그리고

NIH3T3 cell 또한 안정적인 배양과 함께 이미지를 확인하였다. 이 방법을 조금 더 응용하여 항체를 이용한 금표지법 또는 동결파단법 등을 적용하여 본다면 흥미로운 결과도 출될 것이라 생각된다. 본 연구방법은 다양한 배양세포의 형태적 특징을 높은 해상력으로 관찰할 수 있는 좋은 방법이 될 것이며 배양세포의 3차원적 구조의 확인 및 재구성에 활발하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Aizu S, Itoh T, Yamamoto TY: A simple method for whole-cell preparation in electron microscopy. *J Microsc* 124(Pt 2) : 183-187, 1981.
- Goldstein S, Moerman EJ, Porter K: High-voltage electron microscopy of human diploid fibroblasts during ageing in vitro. Morphometric analysis of mitochondria. *Exp Cell Res* 154(1) : 101-111, 1984.
- 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.
- Kim HW, Kim JW, Rhyu IJ: The high-voltage electron microscopy in biomedical research. *Korean J Anat* 42(2) : 73-81, 2009a. (Korean)
- Kim IH, Park SK, Hong ST, Jo YS, Kim EJ, Park EH, Han SB, Shin HS, Sun W, Kim HT, Soderling SH, Kim H: Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase a functions as a scaffold for synaptic Rac signaling. *J Neurosci* 29(44) : 14039-14049, 2009b.
- 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 : 21-24, 2004.
- Lee KJ, Park CH, Rhyu IJ: Efficient three-dimensional reconstruction of synapse with high-voltage electron microscopy. *J. Electron Microsc* 54(2) : 139-141, 2005.
- 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.
- Mun JY, Lee KE, Han SS: Techniques for cryo-electron tomography in biological field. *Korean J Electron Microsc* 38(2) : 73-79, 2008. (Korean)
- 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.
- Rusca E: The development of the electron microscope and its fields of application. *Br J Appl Phys* 6 : 391-399, 1955.
- Yoshida M, Uno F, Nii S: High voltage electron microscopy of whole cells infected with herpes simplex virus type 1. *J Electron Microsc* 35(1) : 47-59, 1986.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Schematic illustration of whole mount preparation method for primary cultured neuron observed under HVEM.
- Fig. 2.** HVEM images of primary cultured neuron using whole mount preparation technique. (a, b) Low magnification images of primary cultured neuron under HVEM. Neuronal dendrite (D) and spine (arrow) were observed easily. (c) Making of stereo paired images ( $-8^\circ$ ,  $+8^\circ$ ) of primary cultured neuron on high magnification for more reliable structure ( $\times 12,000$ ). Three-dimensional structure of dendritic spine neck (arrow head) and direction of dendrite was confirmed. (d) Anaglyphic image was made of previous stereo pair images (Fig. 2c) using Anamaker<sup>®</sup> software. Scale bars: 1  $\mu\text{m}$ .

