



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

개군소 신경세포 안정 막전압의
온도 변화에 대한 영향

濟州大學校 大學院

物理學科

崔始榮

2011年 2月

개군소 신경세포 안정 막전압의
온도 변화에 대한 영향

指導教授 玄南奎

崔始榮

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

崔始榮의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2011年 2月

The Effect of Temperature Change
on the Resting Membrane Potential
in *Aplysia juliana* Neurons

Si Young Choi

(Supervised by professor Nam Gyu Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of
Master of Natural Science

2011. 2.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....
Date

Department of Physics
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

그림 목록.....	ii
표 목록.....	iii
SUMMARY.....	iv
I. 서론.....	1
II. 골드먼-호지킨-카츠(Goldman-Hodgkin-Katz) 방정식.....	3
III. 실험 재료 및 방법.....	14
1. 실험 기구.....	14
2. 재료 및 방법.....	16
1) 실험동물.....	16
2) 수족관.....	17
3) 해수 공급.....	17
4) 시약 제조.....	18
5) Sylgard plate 제작.....	19
6) 미세 전극 제작.....	20
7) 개군소의 해부.....	22
8) 온도 변화에 대한 안정 막전압의 측정.....	23
IV. 결과 및 고찰.....	25
1. 보정 전 온도 변화에 대한 안정 막전압(V_r)의 그래프.....	25
2. 온도 변화에 대한 L-15:ASW(1:1, v/v) 용액의 전위(V) 그래프.....	31
3. 보정 후 온도 변화에 대한 안정 막전압(V_r)의 그래프.....	36
4. 실험값과 이론값 비교.....	39
5. 고찰.....	41
V. 결론.....	44
<참고 문헌>.....	45

그림 목 록

그림 1. 세포막에서 이온 운동을 나타낸 1차원 생물계.....	4
그림 2. 안정 막전압 및 온도 동시 측정 장치.....	15
그림 3. 미세 유리관 끝을 부드럽게 하기 위한 가스 버너 장치.....	16
그림 4. 미세 전극 조작기.....	16
그림 5. 개군소(<i>Aplysia juliana</i>).....	17
그림 6. Sylgard plate와 부분 페인트칠 된 petridish.....	20
그림 7. 제작된 미세 전극.....	21
그림 8. 개군소의 신경절.....	22
그림 9. 전기신호를 측정한 개군소 등쪽 복부 신경절.....	24
그림 10. 신경세포 1의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화.....	26
그림 11. 신경세포 2의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화.....	27
그림 12. 신경세포 3의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화.....	28
그림 13. 신경세포 4의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화.....	29
그림 14. 신경세포 5의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화.....	30
그림 15. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 1의 온도 변화에 대한 전위의 변화.....	32
그림 16. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 2의 온도 변화에 대한 전위의 변화.....	33
그림 17. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 3의 온도 변화에 대한 전위의 변화.....	34
그림 18. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 4의 온도 변화에 대한 전위의 변화.....	35
그림 19. 온도 변화에 대한 안정 막전압과 보정.....	37
그림 20. 온도 변화에 대한 안정 막전압의 실험값과 이론값 비교.....	40
그림 21. 모니터에 나타난 신경세포의 전기 신호.....	42

표 목 록

표 1. RT/F 값.....	13
표 2. 미세 전극 제작시 사용했던 data.....	21
표 3. 온도 변화에 대한 보정 전과 보정 후의 안정 막전압(V_r).....	38
표 4. 안정 막전압의 실험값과 이론값 비교.....	39



SUMMARY

Temperature is one of the most important stimuli that produces a number of effects in most organisms. *Aplysia juliana* were used for experiments. *Aplysia* can be stressed by heat over a long period(16 hours), and it is possible to conduct long-term intracellular recordings.

The mean values and standard deviations of the resting membrane potential from all of the five silent cells in the right ganglion of *Aplysia juliana* showed apparent tendencies of hyperpolarization with increasing temperature over a range of 10°C to 34°C. This hyperpolarization occurred about 4 mV with temperature range from 16°C to 26°C.

The results of this experiments will be helpful to understand the mechanisms of the beating, bursting and chaotic electric signals from *Aplysia* neurons generated from stimuli of temperature change.

I. 서론

흥분성 신경세포의 안정 막전압(resting membrane potential)이 어떻게 활동 전위(action potential)를 일으키며 그것이 어떻게 전달되는 지에 관련된 신경계의 전기생리학적 메커니즘은 잘 알려져 있다. Hodgkin과 Huxley는 오징어(Loligo Squid)를 실험동물로 사용하여 거대 축삭(axon)의 세포막 주변부와 중심부에서의 활동 전위의 개시와 전달을 이온 메커니즘으로 설명하였다 [1-3]. 그들은 전압고정법(voltage clamp method)를 이용하여 막전압(membrane potential)을 고정한 후에 K^+ , Na^+ , Cl^- 등의 이온 전류(ionic current)를 측정하였다. 그리고 막전압을 전기용량성 전류(capacitive currents)과 이온 전류의 합으로 나타내었으며, 그 막전압을 구할 수 있는 비선형 1계 연립 미분방정식을 만들었다. 이 신경 모형을 Hodgkin-Huxley(HH) 모델이라 부른다.

대부분의 생물에서 가장 중요한 자극 중의 하나가 온도이다. 특히 신경 세포의 활동에 대한 온도 변화의 효과가 다양한 방식으로 연구되어 왔다. Hodgkin과 Katz는 실험동물로 오징어(*Loligo forbesi*)를 사용하여 축삭에 온도를 3-20°C 증가시켰을 때 안정 막전압이 낮은 온도에서 아주 조금 감소하고, 높은 온도에서는 뚜렷하게 증가하는 결과를 얻었다 [4].

연체동물인 바다 달팽이(군소; *Aplysia*)를 실험동물로 사용하여 온도가 신경계에 어떤 영향을 끼치는 지에 대한 연구도 이루어져왔다. Carpenter는 *Aplysia californica*, *A. dactylovela*, 그리고 *A. vaccaria* 등을 실험동물로 사용하여 온도를 증가시키면 그 신경세포들의 안정 막전압이 증가함을 보였다 [5]. Hakozaiki, Matsumoto 그리고 Sasaki는 *Aplysia kurodai*를 실험동물로 사용하여 22-32°C 온도 범위에서 온도를 증가시켰을 때 과분극(hyperpolarization)이 15-30 mV 일어난다는 것을 보고하였다 [6].

특히 Lorenzo는 *Aplysia californica* 복부 신경절의 오른쪽에 위치한 비교적 큰 신경세포를 실험하였는데, 온도에 직접적으로 관계함을 보여주는 Nernst 방정식을 이용하여 이론값, 즉 네른스트 전압(Nernst potential)을 계산하였다. 이론값은 온도를 10-20°C 증가시켰을 때 안정 막전압이 -55 mV에서 -57 mV로 약 3.6%

증가하였다. Lorenzo는 온도를 증가시키면 세포막 주변에 K^+ , Na^+ , Cl^- 등의 이온들의 새로운 농도 차이를 일으켜서 막전압의 변화가 생긴다는 것을 밝혔다 [7]. 이러한 연구들은 군소의 신경세포의 안정 막전압이 온도 변화의 영향을 받는다는 것을 잘 보여주었다. 그러나 장시간 동안 기록한 실험 데이터를 제시하지 않았기 때문에 온도 변화에 대한 군소 신경계의 전기 신호 분석이 뚜렷한 재현성을 갖추는 것을 보이는 데 미흡하였다. 특히 silent cell의 안정 막전압의 온도 변화에 대한 영향에 관련된 연구가 많이 이루어지지 않았다.

군소는 신경세포수가 약 2만개이며 직경이 $50-100\mu m$ 정도 되는 큰 신경세포들을 가지고 있기 때문에 동정이 가능하다 [8]. 특정한 생리 현상을 연구하는 데에는 매우 적당한 동물계(animal system)가 존재한다는 Krogh 원리 [9]에 의거하여 보면, 군소는 환원적인 방법으로 신경세포의 안정 막전압의 온도 의존성을 연구하는데 실험동물로 적합하다.

본 연구를 위하여 실험동물로는 개군소(*Aplysia juliana*)를 사용하였다. 개군소는 참군소(*Aplysia kurodai*), 그리고 학습과 기억에 대한 연구를 위해 Eric R. Kandel 연구팀이 사용했던 군소(*Aplysia californica*)와 비교해 볼 때 복부 신경절의 구조가 거의 비슷하다 [10]. 또한 신경세포의 발화 패턴(firing pattern)은 4가지 종류, 즉 silence, beating, bursting, 혼잡형(chaotic) 등으로 나타난다. 대부분의 신경세포는 온도에 대하여 막전압의 변화를 일으키나 모든 신경세포가 똑같지는 않다. 특히 silent cell은 온도에 대하여 안정 막전압의 변화가 가장 예민하게 나타나는 신경세포이다 [11].

본 연구에서는 개군소 복부 신경절(abdomianl ganglion)의 등쪽(dorsal) 오른쪽의 위치한 비교적 큰 silent cell에 온도를 변화시키는 자극을 주었다. $10-34^{\circ}C$ 범위에 해당하는 온도 구간에 대해서 온도를 1시간 동안 증가시키고 다음 1시간 동안 감소시키는 동안 디지털 오실로스코프에서 신호를 관찰하는 동시에 약 16시간 동안의 데이터를 컴퓨터에 기록하고 오리진(OrginPro 7.5)을 사용하여 안정 막전압의 온도 변화에 의한 영향을 정량적으로 분석하고자 한다. 또한 그 결과를 개군소와 유사한 종인 *Aplysia californica*를 실험동물로 사용하여 Lorenzo가 발표한 이론값, 실험값 [7]과 정성적으로 대비하여 안정 막전압의 온도 변화에 대한 영향을 고찰하고자 한다.

II. 골드먼-호지킨-카츠(Goldman-Hodgkin-Katz) 방정식

인간과 동물에서 전기신호는 해리된 이온들 즉 K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} 등에 의하여 전달된다. 이 이온들이 이동하며 양전하와 음전하를 운반한다. 흥분성 신경세포에서 두께가 약 70\AA 정도로 얇은 세포막을 가로지르는 이온들의 운동이 세포막에서 전위의 변화를 가져온다. 이 전위의 변화는 생물학적 정보를 담고 있는 중요한 신호로서 세포의 한 부분으로부터 다른 부분으로 전달된다.

생물계에서 이온들은 균일하게 분포되어 있지 않다. 세포막을 경계로 이온의 농도가 매우 다르게 나타난다. 예를 들어 K^+ 이온의 농도는 대부분의 동물 세포에서 세포 내부가 외부보다 약 20-100배 정도 높다. Na^+ 이온의 농도는 세포 내부가 외부보다 약 1/5-1/15배 정도 낮고, Cl^- 이온의 농도는 세포 내부가 외부보다 약 1/20-1/100배 정도 낮으며 K^+ 이온의 농도 분포와 반대이다 [12]. 이러한 이온 분포의 차이로 인하여 농도 기울기(concentration gradients)가 생긴다. 열역학적 원리에 의하여 이온들은 농도가 높은 곳에서 낮은 곳으로 움직이는 확산(diffusion)이 일어난다. 또한 해리된 이온들은 전하를 운반하기 때문에 세포막 내에 전기장(electric fields)이 형성되어 그 영향으로 이온들은 표류(drift)한다.

생물계의 알짜 전하는 0이다. 이것을 공간-전하 중성성(space-charge neutrality)이라 부른다. 하지만 각 세포의 세포막 내에서는 공간-전하 중성성이 성립하지 않는다. 세포막 근처에서 전하가 분리되는 현상이 나타나기 때문이다. 이러한 분극(polarization) 현상 때문에 신경세포가 휴지(rest) 또는 안정 상태에 있을 때 고유한 막전압(membrane potential)이 생기게 된다. 막전압을 형성하는데 기여하는 이온들은 전체 이온들의 0.1%보다 더 작다 [13].

세포막은 다른 이온들보다 K^+ 이온에 대해서 비교적 쉽게 투과시킨다. 즉 세포막은 선택적 투과성(selective permeability)을 가진다. 실제로 K^+ 이온은 Na^+ 이온보다 이온 반경(ion radius)이 크지만 세포 내부와 외부의 수용액에서 수화(hydrated)되면 유효한 직경(effective diameter)이 Na^+ 보다 작아서 세포막을 통과하기에 상대적으로 쉽다. 이 K^+ 이온은 세포막이 안정 막전압을 갖는 데에 가장 크게 기여한다. 세포막에 박혀있는 작은 구멍들(pores) 또는 이온 통로(ion

channels)를 통하여 이온들이 이동한 결과로 생기는 이온의 분리로 인하여 세포막을 가로지르는 방향으로 전기장이 형성된다.

이온들이 x축만을 따라 움직이는 1차원 계(one-dimensional system)이며, 세포막(두께 $d=|x_2-x_1|$)을 균일하고 무한한 평행판이라고 가정하자. 개략적인 모형이 그림 2에 나타나 있다. 이렇게 생물계를 단순화하는 것은 이온들이 세포막을 가로지르는 운동을 하기 때문이다. 이온들의 운동을 설명하는 두 가지 물리학 법칙을 보이코자 한다: 첫째는 농도 차이에 의한 이온들의 확산이다. 둘째는 전기장의 영향으로 인한 이온들의 표류(drift)이다.

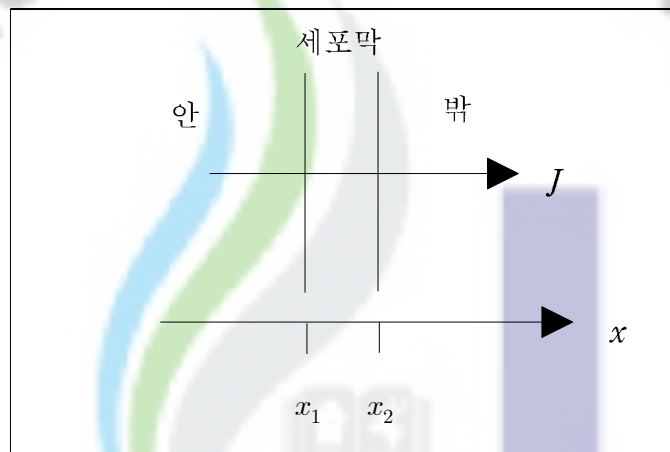


그림 1. 세포막에서 이온 운동을 나타낸 1차원 생물계

먼저, 농도 기울기가 작아지는 방향으로 확산이 일어난다. 이것을 픽의 법칙(Fick's law)이라 불리며 [13], 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$J_{diff} = -D \frac{\partial [C]}{\partial x} \quad (1)$$

식 (1)에서 확산 선속(flux) J_{diff} (molecules/sec-cm²)이 기울기의 크기에 직접적으로 비례하는 확산 계수를 상수로 나타냄을 보여준다. 여기서 D 는 확산 계수 (cm²/sec), $[C]$ 는 이온 농도 (molecules/cm³)이다.

한편, 생물계에서 전하를 가진 입자들, 즉 이온들은 세포 막을 가로지르는 전기장에 의한 힘을 받아서 움직이나 종속도 형태인 표류 속도(drift velocity)로 움직인다. 표류 속도는 이동도와 힘/mole의 곱으로 나타낸다. 이때 이온 선속 $J_{diff} =$

$[C] \times$ (표류 속도)이므로 다음 식으로 나타낼 수 있는데, 이것이 표류에 대한 옴(ohm)의 법칙이다 [13].

$$\begin{aligned} J_{drift} &= [C] \cdot v_{drift} \\ &= [C] \mu E \\ &= -\mu [C] \frac{\partial V}{\partial x}, \end{aligned} \quad (2)$$

여기서 $v_{drift} = \mu E$ [14], E 는 전기장(V/cm) $= -\frac{\partial V}{\partial x}$, V 는 전위(V), μ 는 이동도(mobility)(cm²/V-sec)이다.

Einstein은 열적 평형(thermal equilibrium) 상태에서 확산과 표류 사이의 관계식을 세웠는데 [13], 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$D = \frac{RT}{zF} \mu = \frac{RT}{zN_A e} \mu = \frac{kT}{ze} \mu = \frac{kT}{q} \mu, \quad (3)$$

여기서 R 는 기체 상수(1.98cal/°K-mol), T 는 절대 온도(°K), z 는 이온 원자가(단위가 없다), F 는 Faraday 상수(96,480C/mol), N_A 는 Avogadro 상수(6.02×10^{23} /mol), k 는 Boltzmann 상수(1.38×10^{-23} joule/°K), e 는 원소의 전기적 전하(1.602×10^{-19} C), q 는 분자의 전하(C)이다.

그러므로 이온들은 농도 기울기와 전기장의 영향을 받아서 세포막을 가로질러 운동하므로 식 (1)과 식 (2)를 합하고, 식 (3)에서 나타난 Einstein 관계식을 이용하여 총이온 선속을 구할 수 있는데 다음과 같이 표현된다.

$$\begin{aligned} J &= J_{drift} + J_{diff} \\ &= -\mu [C] \frac{\partial V}{\partial x} - D \frac{\partial [C]}{\partial x} \\ &= -\left(\mu [C] \frac{\partial V}{\partial x} + \frac{\mu k T}{q} \frac{\partial [C]}{\partial x} \right). \end{aligned} \quad (4)$$

이 식 (4)를 네른스트-프랑크(Nernst-Planck) 방정식(NPE)이라고 부른다 [13].

또한 NPE를 다음과 같이 전류밀도 \vec{J} (current density)(mol/sec-cm²)로 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned}\vec{J} &= \frac{J}{N_A} = \frac{-\mu[C]}{N_A} \frac{\partial V}{\partial x} - \frac{\mu k T}{N_A q} \frac{\partial [C]}{\partial x} \\ &= -\left(u[C] \frac{\partial V}{\partial x} + u \frac{RT}{zF} \frac{\partial [C]}{\partial x}\right),\end{aligned}\quad (5)$$

여기서 u 는 $\frac{\mu}{N_A}$ 로서 몰 이동도(molar mobility)($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{mol}^{-1}$)이다.

세포막 전류 I_m (A/cm^2)는 이온 전속과 운반하는 전하의 곱이기 때문에 전체 몰 전하와 몰 전속, 즉 zF 와 전류밀도의 곱으로서 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned}I_m &= \vec{J} \cdot zF = -\left(u zF[C] \frac{\partial V}{\partial x} + u zF \frac{RT}{zF} \frac{\partial [C]}{\partial x}\right) \\ &= -\left(u zF[C] \frac{\partial V}{\partial x} + u RT \frac{\partial [C]}{\partial x}\right),\end{aligned}\quad (6)$$

여기서 (-) 표시는 만일 이온 원자가 (+)이면 전류는 $\frac{\partial V}{\partial x}$, $\frac{\partial [C]}{\partial x}$ 에 대하여 반대 방향으로 흐르고, 만일 이온 원자가 (-)이면 $\frac{\partial V}{\partial x}$ 에 대하여 반대 방향으로 흐르지만, $\frac{\partial [C]}{\partial x}$ 에 대해서는 같은 방향으로 흐른다는 것을 보여준다. 식 (6)을 보면 농도 기울기와 전기장, 즉 전기화학퍼텐셜(electrochemical potentials)에 의하여 흐르는 이온 전류(ionic current)를 표현해주고 있음을 알 수 있다.

세포막이 휴지(rest) 상태에 있을 때 키르히호프(Kirchhoff) 법칙, 즉 $\sum_{\text{결합점}} i = 0$ 에 의거하여 세포막을 가로지르는 알짜 세포막 전류(net cross-membrane current)는 0이며 다음 식과 같이 나타낼 수 있다 [15].

$$I = -\left(u zF[C] \frac{\partial V}{\partial x} + u RT \frac{\partial [C]}{\partial x}\right) = 0.\quad (7)$$

식 (7)를 이항하고 적분하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{\partial V}{\partial x} = -\frac{RT}{zF} \frac{1}{[C]} \frac{\partial [C]}{\partial x},$$

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dV}{dx} dx = -\frac{RT}{zF} \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{[C]} \frac{d[C]}{dx} dx,$$

$$\int_{V_1}^{V_2} dV = -\frac{RT}{zF} \int_{[C]_1}^{[C]_2} \frac{1}{[C]} d[C],$$

$$V_2 - V_1 = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[C]_2}{[C]_1}. \quad (8)$$

이로써 세포막이 휴지 상태에 있을 때의 안정 막전압 V_r 이 다음과 같이 정의된다.

$$V_r \equiv V_i - V_o = V_1 - V_2 = -(V_2 - V_1) = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[C]_o}{[C]_i}, \quad (9)$$

여기서 V_i 는 세포막 내부의 전압, V_o 는 세포막 외부의 전압이다. 이 식 (9)를 네른스트 방정식(Nernst equation)이라 부른다 [13]. 대부분의 동물 세포에서 이온들의 농도 분포는 전형적으로 $[K^+]_i > [K^+]_o$, $[Na^+]_i < [Na^+]_o$, $[Cl^-]_i < [Cl^-]_o$, $[Ca^{2+}]_i < [Ca^{2+}]_o$ 으로 나타나기 때문에 [12], 네른스트 방정식에 의하여 막전위를 각각 구하면 V_{K^+} , V_{Cl^-} 는 (-) 값을 나타내지만 V_{Na^+} , $V_{Ca^{2+}}$ 는 (+) 값을 나타낸다. V_{K^+} 값이 안정 막전압값과 거의 일치한다. 네른스트 방정식은 세포막의 안정 막전압이 온도에 직접적으로 관련되어있음을 보여준다. 네른스트 방정식은 세포막을 투과하는 단일 이온에 대하여 안정 막전압을 구하는 식이다.

단일 이온이 아니라 K^+ , Na^+ , Cl^- 이온들을 모두 고려한 방정식을 유도해보자. $\mu = zDF/RT$, $D = \mu kT/q$ 이므로 식 (4)를 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned} J &= -\left(\mu[C] \frac{\partial V}{\partial x} + \frac{\mu kT}{q} \frac{\partial [C]}{\partial x} \right) \\ &= -\frac{FD}{RT} z[C] \frac{\partial V}{\partial x} - D \frac{\partial [C]}{\partial x}. \end{aligned} \quad (10)$$

이때, 식 (10)에 F 를 곱하고, $z=+1$, $[C]=[K^+]$, $dx=d$, $\alpha = FD_{K^+}$, $\beta = \frac{F^2 D_{K^+} V_r}{RTd}$,

$\frac{\partial V}{\partial x} = -V_r$ 라고 하면 [16], 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned}
-\alpha \frac{d[K^+]}{dx} + \beta[K^+] &= J_{K^+}, \\
-\alpha \frac{d[K^+]}{dx} &= J_{K^+} - \beta[K^+], \\
\alpha \frac{d[K^+]}{dx} &= \beta[K^+] - J_{K^+}. \tag{11}
\end{aligned}$$

이때, $\lambda = \beta[K^+] - J_{K^+}$ 라고 하면 $d\lambda = \beta d[K^+]$, $d[K^+] = \frac{1}{\beta} d\lambda$, $\alpha \frac{\frac{1}{\beta} d\lambda}{dx} = \lambda$
 $\frac{1}{\beta} \frac{d\lambda}{\lambda} = \frac{1}{\alpha} dx$ 이다. 이 식의 양변을 적분하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\int \frac{1}{\beta} \frac{d\lambda}{\lambda} = \int \frac{1}{\alpha} dx, \tag{12}$$

$$\frac{1}{\beta} \ln \lambda = \frac{x}{\alpha} + C,$$

$$\lambda = A e^{\frac{\beta}{\alpha} x},$$

$$\beta[K^+] - J_{K^+} = A e^{\frac{\beta}{\alpha} x}. \tag{13}$$

이때, $\frac{\beta}{\alpha} = \frac{F^2 D_{K^+} V_r}{RTd} = \frac{F V_r}{RTd}$ 이므로 $[K^+]$ 에 대한 일반적인 해를 구하면 다음과 같다.

$$[K^+] = \frac{A e^{\frac{\beta}{\alpha} x}}{\beta} + \frac{J_{K^+}}{\beta} = B e^{\frac{F V_r x}{RTd}} + \frac{J_{K^+} R T d}{F^2 D_{K^+} V_r}. \tag{14}$$

이 식 (14)를 식 (12)에 대입하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{1}{\beta} \int \frac{d\lambda}{\lambda} = \frac{1}{\alpha} \int dx,$$

$$\frac{1}{\beta} \int_{[K^+]_i}^{[K^+]_o} \frac{d(\beta[K^+] - J_{K^+})}{\beta[K^+] - J_{K^+}} = \frac{1}{\alpha} \int_0^d dx ,$$

$$\frac{1}{\beta} \ln \frac{\beta[K^+]_o - J_{K^+}}{\beta[K^+]_i - J_{K^+}} = \frac{d}{\alpha} ,$$

$$\ln \frac{\beta[K^+]_o - J_{K^+}}{\beta[K^+]_i - J_{K^+}} = \frac{\beta d}{\alpha} = \frac{\frac{F^2 D_{K^+} V_r}{RT d} d}{F D_{K^+}} = \frac{F V_r}{RT} ,$$

$$\frac{\beta[K^+]_o - J_{K^+}}{\beta[K^+]_i - J_{K^+}} = e^{\frac{F V_r}{RT}} ,$$

$$J_{K^+} \left(e^{\frac{F V_r}{RT}} - 1 \right) = e^{\frac{F V_r}{RT}} \beta [K^+]_i - \beta [K^+]_o = e^{\frac{F V_r}{RT}} \beta \left([K^+]_i - [K^+]_o e^{-\frac{F V_r}{RT}} \right) ,$$

$$J_{K^+} e^{\frac{F V_r}{RT}} \left(1 - e^{-\frac{F V_r}{RT}} \right) = e^{\frac{F V_r}{RT}} \beta \left([K^+]_i - [K^+]_o e^{-\frac{F V_r}{RT}} \right) ,$$

$$J_{K^+} = \beta \frac{[K^+]_i - [K^+]_o e^{-\frac{F V_r}{RT}}}{1 - e^{-\frac{F V_r}{RT}}} = \frac{F^2 D_{K^+} V_r}{RT d} \frac{[K^+]_i - [K^+]_o e^{-\frac{F V_r}{RT}}}{1 - e^{-\frac{F V_r}{RT}}} . \quad (15)$$

같은 방법으로 J_{Na^+} , J_{Cl^-} 을 계산하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$J_{Na^+} = \frac{F^2 D_{Na^+} V_r}{RT d} \frac{[Na^+]_i - [Na^+]_o e^{-\frac{F V_r}{RT}}}{1 - e^{-\frac{F V_r}{RT}}} , \quad (16)$$

$$J_{Cl^-} = \frac{F^2 D_{Cl^-} V_r}{RT d} \frac{[Cl^-]_i - [Cl^-]_o e^{\frac{F V_r}{RT}}}{1 - e^{\frac{F V_r}{RT}}} . \quad (17)$$

이 때, 투과율(permeability coefficient) $P_{ion} = \frac{D_{ion}}{d}$ 이므로 식 (15), (16), 그리고 식 (17)을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$J_{K^+} = \frac{P_{K^+} F^2 V_r}{R T} \left(\frac{[K^+]_i - [K^+]_o e^{-\frac{F V_r}{R T}}}{1 - e^{-\frac{F V_r}{R T}}} \right), \quad (18)$$

$$J_{Na^+} = \frac{P_{Na^+} F^2 V_r}{R T} \left(\frac{[Na^+]_i - [Na^+]_o e^{-\frac{F V_r}{R T}}}{1 - e^{-\frac{F V_r}{R T}}} \right), \quad (19)$$

$$\begin{aligned} J_{Cl^-} &= \frac{P_{Cl^-} F^2 V_r}{R T} \left(\frac{[Cl^-]_i - [Cl^-]_o e^{\frac{F V_r}{R T}}}{1 - e^{\frac{F V_r}{R T}}} \right) \\ &= \frac{P_{Cl^-} F^2 V_r e^{\frac{F V_r}{R T}} \left([Cl^-]_i e^{-\frac{F V_r}{R T}} - [Cl^-]_o \right)}{R T \left(e^{\frac{F V_r}{R T}} \left(e^{-\frac{F V_r}{R T}} - 1 \right) \right)} \\ &= \frac{P_{Cl^-} F^2 V_r}{R T} \left(\frac{[Cl^-]_o - [Cl^-]_i e^{-\frac{F V_r}{R T}}}{1 - e^{-\frac{F V_r}{R T}}} \right). \end{aligned} \quad (20)$$

평형 조건, 즉 세포막이 휴지 상태에 있을 때 총 이온 전속은 0이다 [15].

$$J_{K^+} + J_{Na^+} + J_{Cl^-} = 0. \quad (21)$$

식 (21)에 식 (18), (19), 그리고 식 (20)을 대입하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned} &P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o \\ &- \left(P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i \right) e^{-\frac{F V_r}{R T}} = 0, \\ &\frac{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o}{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i} = e^{-\frac{F V_r}{R T}}, \\ &\ln \left[\frac{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o}{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i} \right] = \ln e^{-\frac{F V_r}{R T}} \\ &= -\frac{F V_r}{R T}. \end{aligned} \quad (22)$$

이로써 여러 가지 이온에 대한 일반적인 네른스트 방정식이 다음과 같이 유도된다.

$$V_r = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o} \right]. \quad (23)$$

이 식 (23)을 골드먼-호지킨-카츠(Goldman-Hogkin-Katz)(GHK) 방정식이라 부른다 [16]. 이 GHK 방정식에 각 이온의 세포 안과 밖의 농도를 대입하여 안정 막전압의 이론값을 계산한다. 그러나 본 연구에서는 세포 내 이온 농도 측정실험을 하지 않았으므로 세포 안의 농도를 알 수 없어서 식 (23)을 바로 적용하여 이론값을 계산할 수 없다. 그런데 세포 외액이나 세포 내액에는 K^+ , Na^+ , Cl^- 이온 외에 Ca^{2+} , Mg^{2+} 등의 이온이 있으므로 GHK 방정식을 사용하여 이론값을 계산하는 것은 적합하지 않다. 특히 이 방정식에서 각 이온 농도들의 온도 의존성은 반영하지 않았으므로 정확한 방정식이라 볼 수는 없다. 그러나 생물물리학 논문에서는 이론적인 논의가 필요하기 때문에 이 실험 결과를 이론적으로 설명하기 위해서 도입할 수 있는 방정식은 GHK 방정식 정도이다.

여기서 Lorenzo의 연구에서 보고된 이론값과 실험값의 차이, 그리고 본 연구의 실험값과의 차이를 정성적으로 대비하여 고찰할 목적으로 식 (23)의 GHK 방정식의 ln 함수의 진수 부분을 단순하게 고치고자 한다. 그렇게 하면 온도 변화에 의한 silent cell의 안정 막전압의 변화에 관련된 과분극(hyperpolarization) 현상에 대해서도 논의할 수 있을 것이다.

공간 전하 중성성에 의거하여 세포 안팎의 안정 막전압이 100 mV 일 때에, 세포 내외의 이온 농도가 0.5 M인 경우에, 세포막 근처에 있는 짝짓지 않은 이온은 세포막 내부에 전하가 상쇄된 이온들의 0.002% 정도가 된다 [13]. 본 연구의 실험에서 10°C 온도 변화에 대하여 막전압이 4 mV 정도의 변화가 있게 되므로, 이때 세포막의 짝짓지 않은 이온들의 수의 변화는 세포 내부의 이온 변화에 대하여 매우 적다. 그리고 몰농도 = $\frac{\text{물질의 mol 수}}{\text{용액의 부피}(L)}$ 인데 10°C 변화에 대하여 용액의 부피(L)도 크게 변화하지 않는다. 만일 $T=T_1$ 일 때의 각 이온의 세포 안과 밖의 $[C_j]_{T_1}$ 와 $T=T_2$ 일 때의 $[C_j]_{T_2}$ 값들이 변화하더라도 똑같은 비율로 변화한다면 GHK 방정식에서 ln 함수의 진수 부분을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned} & \ln \left[\frac{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o} \right]_{T=T_1} \\ &= \ln \left[\frac{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o} \right]_{T=T_2} \end{aligned} \quad (24)$$

이 식 (24)를 GHK 방정식에 대입하여 온도가 T_1 , T_2 일 때의 안정 막전압의 비를 계산하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned} & V_r(T_1) : V_r(T_2) \\ &= \frac{RT_1}{F} \ln \left[\frac{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o} \right]_{T=T_1} \\ & : \frac{RT_2}{F} \ln \left[\frac{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o} \right]_{T=T_2} \end{aligned} \quad (25)$$

따라서 10-34 °C 온도 범위에 대해서 세포막 내외의 이온 농도가 크게 변하지 않으면 안정 막전압의 변화율은 온도의 변화율과 같아져서 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{V_r(T_1)}{V_r(T_2)} = \frac{T_1}{T_2} \quad (26)$$

그러므로 안정 막전압의 이론값 V_r 은 온도 T 에 비례하며, RT/F 값에 의해 결정된다. RT/F 값은 표 1에서 보여주고 있다 [17].

이때 $\delta = \ln \left[\frac{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o} \right]$ 라 하면, 온도 T_1 과 T_2 에서의 안정 막전압의 차 ΔV_r 은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\Delta V_r = V_r(T_1) - V_r(T_2) = \frac{RT_1}{F} \delta - \frac{RT_2}{F} \delta = \left(\frac{RT_1}{F} - \frac{RT_2}{F} \right) \delta \quad (27)$$

표 1. RT/F 값 [17]

온도(°C)	RT/F(mV)	2.303 RT/F*(mV)
0	23.54	54.20
5	23.97	55.19
10	24.40	56.18
15	24.83	57.17
20	25.26	58.17
25	25.69	59.16
30	26.12	60.15
35	26.55	61.14
37	26.73	61.54

* $\ln x \doteq 2.303 \log x$

Ⅲ. 실험 재료 및 방법

1. 실험 기구

1) 마취 및 해부용

개군소를 마취하고 해부하기 위해 저울, 접시, 사진 촬영용 수조, 사진기, 핀셋 (coarse forceps), 가위(coarse scissors), 해부판, 해부용 T형 핀, 주사기, 페트리 접시(petri dishes)(작은 크기) 등이 필요하다.

2) 신경절 가위질(trimming)용

개군소 복부 신경절을 해부한 후 불필요한 부분을 제거하기 위해 해부 현미경, illuminator, 미세 핀셋, 미세 가위 등이 필요하다.

3) 단백질 분해효소(protease) 처리 및 세척용

깨끗하게 가위질 된 개군소의 복부 신경절을 단백질 분해효소 처리하고 세척하기 위하여 온도가 34℃로 유지되는 항온순환수조(water bath circulator), safe-lock micro test tube (eppendorf #0030120.086; or eppendorf tube), eppendorf tube rack, 페트리 접시(중간 크기 3개) 등이 필요하다.

4) 신경세포의 안정 및 보관용

단백질 분해효소 처리된 개군소의 복부 신경절을 안정시키기 위하여 18℃로 유지되는 저온 배양기(incubator)가 필요하다.

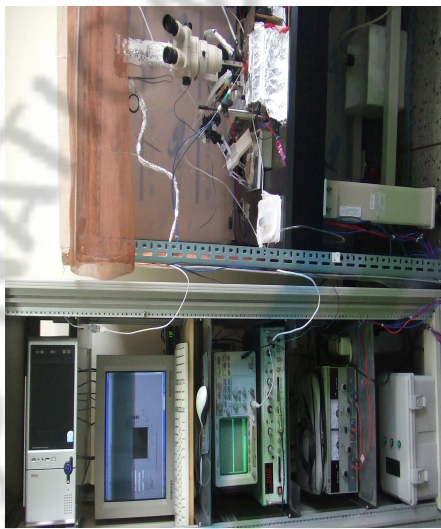
5) 신경절의 껍질 제거용

Protease 처리되고 안정된 개군소 복부 신경절의 껍질을 제거하기 위하여 해부 현미경, illuminator, 미세 핀셋, 미세가위, 미세 핀, sylgard plate, micropipet(200 μ l 적당), micropipet tip, micropipet tip rack 등이 필요하다.

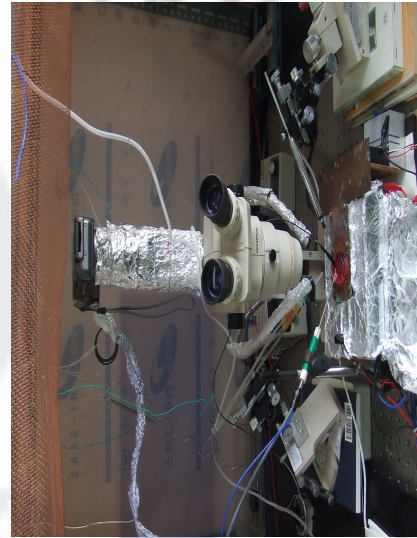
6) 전위 측정용

개군소의 해부를 마친 후 복부신경절 신경세포의 전기신호를 측정하기 위하여 제진대(antivibration table), 공기 압축기(air compressor), 연결 BNC 케이블, 증폭기(DC neuroprobe amplifier model 1600), head stage, reference electrode cell, o-ring이 부착된 유리전극 홀더(glass electrode holder), 해부 현미경, CCD

monitor system, illuminator, 구리망(Faraday cage), 미세조작기(micromanipulator), 디지털 오실로스코프, 미세전극(microelectrode), 전원공급장치(power supply), 컴퓨터, A/D converter, 열전소자(themoelement), 디지털 카메라, 디지털 지시기(digital indicator), 열전대(thermocouple), 자동 온도조절장치 등이 필요하다. 그림 2는 안정 막전압 및 온도 동시 측정 장치의 전체 모습을 보여준다. 컴퓨터, 모니터, 디지털 오실로스코프, 증폭기, 자동 온도조절장치, 해부 현미경, 미세 조작기, 열전대, 제진대 등이 그림에 나타나 있다 [18].



(a)



(b)

그림 2. 안정 막전압 및 온도 동시 측정 장치. (a) 컴퓨터, 모니터, 디지털 오실로스코프, 증폭기, 자동 온도조절장치. (b) 해부 현미경, 미세 조작기, 열전대, 제진대 등

7) 미세 전극 제작용

미세 전극을 제작하기 위하여 준비과정에 필요한 가스 장치 [그림 3.], 미세 유리관, 미세 전극 조작기(microelectrode puller) [그림 4.], 현미경 등이 필요하다.



그림 3. 미세 유리관 끝을 부드럽게 하기 위한 가스 버너 장치



그림 4. 미세 전극 조작기

2. 재료 및 방법

1) 실험동물

실험동물은 제주특별자치도 남제주군 성산읍 신양리 앞바다에 서식하는 개군소이다. 제주의 해녀들은 개군소를 ‘통굴멍이’라고 부르며 식용으로 사용한다. 유사한 종으로 참군소가 있는데, 제주 해녀들은 ‘참굴멍이’라고 부른다. 참군소는 하얀 점무늬가 많으며 건드리면 파란 잉크를 내뿜고 귀 모양처럼 생긴 촉각이 크고 길쭉하다. 반면에 개군소는 여러 종류가 있는데 색깔이 검붉고 건드리면 하얀 물을 낸다. 검붉은 빛을 띠는 개군소 사진을 그림 5에 보여주고 있다. 해녀가 아침 일찍 잡은 군소를 한 번에 약 30마리 정도 구입하여 운반통에 해수와 파래를 같이 넣어 1시간 내에 실험실로 운반하였다. 이 연구에서 사용한 군소는 모두 150마리 정도였다.

군소는 물파래(green laver)를 잘 먹는다. 파래는 제주특별자치도 조천읍 조천리 인근 해안가에서 채집하여 그늘지고 공기가 잘 통하는 곳에서 갈대로 만든 발 위에 펼쳐 말렸다가 하루에 1회 한 움큼씩 수족관에 넣어주었다. 먹이를 너무 많이 주면 수족관의 오염이 심해지거나 생식활동이 왕성해져 군소가 잘 죽기 때문

에 적당한 양의 먹이를 제공하는 것이 필요하다.

군소는 육지와 가까운 얇은 바다에서 서식하며 문어처럼 1년의 생활환(life cycle)를 가진다. 개군소는 7월경에 나서 다음 해 7월경에 죽는다. 7-8월경부터 바다의 수온이 높아지면 개군소는 하얀 실 또는 노란 실 같은 알을 낳고 죽는다. 수온이 낮아지는 겨울이 되면 어린 군소를 볼 수 있다. 그러므로 개군소를 이용한 실험은 늦가을부터 다음 해 6월경까지가 적합하다.



그림 5. 개군소(*Aplysia juliana*)

2) 수족관

수족관의 구조는 본 수조(1200×900×600), 여과조(300×900×600), 냉각기, 순환 펌프, 에어브로아, 자외선 멸균기, 수중등, 그리고 여과용 솜과 자갈 등으로 되어있다. 본 수조는 중간에 투명하고 작은 구멍이 여러 개 있는 가름대가 있어서 그 구멍 사이로 군소들이 드나든다. 본수조의 해수는 왼쪽에서 오른쪽으로 흘러 여과조를 통해 여과된 다음, 수조 아래의 오른쪽에서 왼쪽으로 흘러 수조의 왼쪽 구멍을 통해 다시 본수조로 순환된다.

3) 해수 공급

수족관에 공급하는 해수는 제주도 조천읍에 위치한 제주대학교 해양과환경연구

소에서 해수를 약 20개의 생수통에 받아 실험실로 운반하여 사용하였다.

4) 시약 제조

(1) 70% 에탄올 제조

증류수와 에탄올의 비가 3:7이 되게 한다.

(2) 0.38M $MgCl_2$ 제조

증류수 1 L에 대하여 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 77.26g을 비이커에 넣고 그것을 stirrer 위에 올려놓는다. Magnetic bar를 사용하여 용액이 잘 섞이게 하고 완전히 녹을 때까지 돌린다.

(3) ASW 제조

증류수 1L에 대하여 $NaCl(460mM)$ 26.8824g, $KCl(10mM)$ 0.7455g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O(11mM)$ 1.6172g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O(55mM)$ 11.1820g, HEPES(10mM) 2.3825g을 증류수 700mL가 들어 있는 비이커에 넣고 그것을 stirrer 위에 올려 놓는다(실제 실험에서는 2배수로 제조하는 것이 적당하다. 즉 증류수 2L, $NaCl(460mM)$ 26.8824×2=53.7648g, $KCl(10mM)$ 0.7455×2=1.4910g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O(11mM)$ 1.6172×2=3.2344g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O(55mM)$ 11.1820×2=22.3640g, HEPES(10mM) 2.3825×2=4.7650g). Magnetic bar를 사용하여 용액이 잘 섞이게 하고 완전히 녹을 때까지 돌린다. 약 2시간 정도가 필요하다. ASW의 pH가 7.55가 되고 최종 부피가 1L가 되도록 조절한다. 먼저 종이 깔때기를 이용하여 여과한 후에 주사기 필터를 사용하여 깨끗하게 여과시킨다. 이때 사용하는 주사기와 주사기 필터(syringe filter)는 단백질 분해효소 처리용 용액을 제조할 때 사용하는 주사기와 주사기 필터보다 더 큰 것을 사용하는 것이 알맞다. 제조된 ASW는 멸균된 시약 병에 넣고 냉장고(4°C)에 넣어 보관한다.

(4) L-15 제조

증류수 1L에 대하여 L-15 14.7g을 증류수 700mL가 들어있는 비이커에 넣고 그것을 stirrer 위에 올려 놓은 다음 magnetic bar를 사용하여 완전히 녹을 때까지 약 1시간 정도 돌린다. 이제 $NaCl$ 14.5g, Dextrose(glucose) 6.24g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 6.24g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.7g, KCl 0.344g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.496g, $NaHCO_3$ 0.192g을 넣고(실제 실험에서는 2배수로 제조하였다. 즉 $NaCl$ 14.5×2=29g, Dextrose(glucose)

6.24×2=12.48g, MgSO₄·7H₂O 6.24×2=12.48g, MgCl₂·6H₂O 5.7×2=11.4g, KCl 0.344×2=0.688g, CaCl₂·2H₂O 1.496×2=2.992g, NaHCO₃ 0.192×2=0.384g) 약 2시간 동안 magnetic bar를 사용하여 완전히 녹을 때까지 돌린다. pH는 7.4-7.5에 맞추고 최종 부피가 1L가 되게 한다. 이것을 0.45μm membrane filter(HATF04700)로 여과한 후 멸균된 시약병에 넣고 여기에 항생제(penicillin/streptomycin 1병)을 첨가한다. 제조된 L-15는 냉장고(4℃)에 보관한다.

(5) 단백질 분해효소 처리용 용액 제조

L-15:ASW(1:1, v/v)인 배양액 7.2375mL을 micropipet을 사용하여 conical tube 속에 빨아 넣는다. 디지털 전자저울을 사용하여 protease 0.0579g을 측정 한 후에 L-15:ASW(1:1, v/v) 배양액이 들어있는 conical tube 속에 잘 털어 놓는다(실제 실험에서는 4배수로 제조하였다. 즉 L-15:ASW(1:1, v/v) 7.2375×4=28.95mL, protease 0.0579×4=0.2376g). 이것을 vortex mixer 위에 올려놓고 회전속도를 알맞게 조절하여 protease를 잘 녹인다. 이제 그것을 주사기로 뽑고 주사기 필터로 여과시킨 후에 새로운 conical tube에 넣는다. 제조된 단백질 분해효소 처리용 용액은 냉장고(4℃)에 넣어 보관한다.

5) Sylgard plate 제작

Sylgard 184(silicone elastomer) 10g과 sylgard 184(curing agent) 1g을 잘 섞는다. 이것을 패트리 접시에 약 1/3정도 채워 넣은 후 무균대 위에서 두어 굳어질 때까지 약 1일을 기다린다. Sylgard plate를 수돗물과 증류수에 차례로 씻은 후에 70% 에탄올이 담긴 비이커에 담갔다가 꺼내어 소독한다. 이제 65℃에서 말린 다음에 무균대에 보관한다. 그림 6는 실험할 때 신경세포의 관찰을 쉽게 하기 위하여 sylgard plate 밑면에 검정색을 칠하고 가장자리 부분을 제거한 모양을 보여준다. 왜냐하면 패트리 접시내의 배양액이 온도 변화를 용이하게 하기 위해서 온도 변화를 sylgard plate 중심부에 집중할 필요가 있기 때문이다.

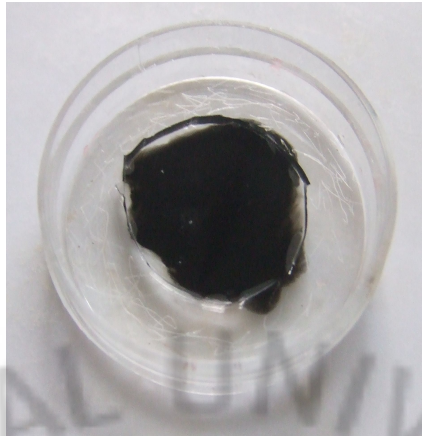


그림 6. Sylgard plate와 부분
페인트칠 된 petridish

6) 미세 전극 제작

미세 전극을 제작하기에 앞서 미세 유리관 끝을 가스 불을 이용하여 날카로운 부분을 부드럽게 한다. 이때 가스 불꽃에 유리관을 빠르게 움직이지 않으면 끝이 녹아서 유리관이 막힐 수 있기 때문에 주의한다.

미세 전극은 제주대학교 공동실험실습관에 있는 미세 전극 조작기를 이용하여 만든다. 먼저 ramp test를 해야한다. 왜냐하면 그 ramp test 값은 유리의 재질과 크기에 따라 결정되는 heat 값을 결정할 수 있는 중요한 기준이 되기 때문이다. 전원 스위치를 키면 LCD 화면상에 “Which program do you wish to use?”(0-9)이 나타나면 아무 숫자나 누른다. 그 다음 CLR 버튼을 누른다. NO=0, YES=1 중에 0을 누른다. 그 다음 NO=1, RAM=1, MTEST=2 중에서 1을 누른다. Puller 전면에 있는 puller bar 위의 V 홈에 미세 유리관을 올려놓고 가운데 위치해 오게 한 후 clamp를 고정한다. 이때 puller bar에 연결된 스프링을 눌러서 걸림을 막아야 한다. Pull 버튼을 누른다. Ramp value 값이 증가하다가 멈춘다. 그러면 필라멘트의 가열로 인하여 미세 유리관의 중간 부분이 가늘어진 상태가 되는데, 이렇게 하여 ramp test가 끝난다.

전원 스위치를 키면 LCD 화면 상에 “Which program do you wish to use?”(0-9)이 나타나면 0을 누르고 enter 버튼을 누른다. 그러면 화면에 다음 값

들이 나타난다.

01 HEAT= PULL= VEL= TIME=

이때 heat, pull, vel, time 값을 입력한다. 미세 전극의 모양을 관찰하면서 입력하는 값의 변화를 준다. Heat 값을 변화시키면 미세 전극을 가늘고 길게 할 수 있다. Pull 값이 크면 전극 끝의 지름이 작아지고 뾰족해진다. 즉 전극의 미세한 구멍의 크기를 변화시킨다. Time 값은 공기 냉각(air cooling)과 관련되어 있으며 약 150-200이 적당한 값으로 알려져 있다. Key pad의 pull 버튼을 누르면 필라멘트가 가열되면서 잠시 후에 미세 전극이 완성된다. 표 2은 실제로 미세 전극을 제작할 때에 그때의 ramp test의 값을 기준으로 적합한 heat, pull, vel, time, press 등을 각각 다르게 입력한 것을 나타낸다. 제작된 미세 전극은 그림 7에서 보여준다.

표 2. 미세 전극 제작시 사용했던 data

HEAT	PULL	VEL.	TIME	PRESS	RAMP TEST
610	120	100	150	500	593
590	120	140	160	500	576
630	150	90	250	490	577
630	150	100	240	500	585
630	150	90	200	500	587

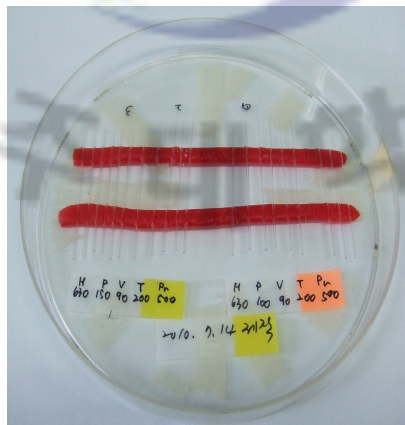


그림 7. 제작된 미세 전극

7) 개군소의 해부

(1) 마취, 해부 및 신경절의 분리

수족관에서 군소를 꺼내서 저울로 무게를 달고 해부판 위에 군소의 등(dorsal surface)을 밑으로 향하여 하여 배 부위(ventral surface)가 위로 향하도록 놓는다. 0.38M $MgCl_2$ 를 군소 체중의 1/2정도 복강에 주사하여 마취시킨다. 이때 주사기의 바늘이 실험 동물의 내장으로 들어가지 않도록 피부의 부푼 부위에 약 45° 각도로 찔러 주입한 후 10분정도 놓아 두어 군소가 마취되기를 기다린다. 군소를 만져봐서 완전히 마취가 된 것을 확인한 후에 해부 접시에 마취된 실험 동물을 핀으로 머리와 꼬리 부위에 꽂아서 고정시킨다. 핀셋으로 발판을 잡아 들어 올리면서 가위로 꼬리 쪽에서부터 머리 쪽으로 길게 일자로 자르고 핀으로 절개된 안쪽의 피부를 바깥으로 가게 하여 5-6군데 고정시켜 군소의 내부 관찰을 용이하게 한다. 군소의 중심 신경절 고리를 관통하고 있는 식도를 절단하고 식도 속에 있는 내용물이 밖으로 나와 신경절을 오염시키지 못하도록 빨리 옆으로 비켜 놓는다. 이제 꼬리 쪽으로 뺀어있고 신경섬유가 짧은 복부 신경절을 분리한다. 그림 8에서 맨 아래 쪽에 신경 섬유가 짧은 것이 복부 신경절이고, 윗부분의 가운데 위치한 것이 중심 신경절(central ganglion)이며 양쪽으로 뺀어있는 것이 구강 신경절(buccal ganglion)의 모습이다 [8, 10]. 분리된 군소의 복부 신경절을 L-15:ASW(1:1, v/v) 배양액이 든 패트리 접시에 넣어 둔다.



그림 8. 개군소의 신경절

(2) 신경절의 가위질, 단백질 분해효소 처리 및 세척

현미경으로 보면서 분리된 신경절을 우선 미세 가위와 미세 집계를 이용해서 불필요한 조직들을 제거한다. 이때의 현미경 배율은 10배가 적당하다. 단백질 분해효소 처리용 용액을 넣은 micro test tube에 준비된 복부 신경절을 넣은 후 34℃로 유지되는 항온 순환수조에서 30분에서 1시간 정도 처리한다. 이 단백질 분해효소 처리 시간을 적절히 조절하지 않으면 신경절의 껍질이 잘 벗겨지지 않거나 신경절에 다리처럼 붙어있는 6개의 신경섬유가 쉽게 끊어져 버려서 배양용기에 고정시키기 어렵게 되기 때문에 주의가 필요하다. Protease 처리된 신경절을 꺼내서 ASW로 채워진 페트리 접시 3개 속에 차례로 옮기면서 그때마다 접시를 약 20번 정도 조심스럽게 흔들어서 신경절의 protease를 깨끗이 세척한다.

(3) 신경절의 안정 및 보관

단백질 분해효소 처리 및 세척된 복부 신경절을 L-15:ASW(1:1, v/v) 배양액에 넣어 온도가 18℃ 유지되는 배양기에서 약 12시간 정도 보관한다.

(4) 신경절의 껍질 제거

복부 신경절을 배양기에서 꺼낸 후 sylgard가 깔린 배양용기에 미세 핀으로 네갈래로 뺀 신경섬유들을 고정시킨다. 이때 현미경의 배율을 10배로 하는 것이 복부 신경절의 전체 모습을 보는데 적당하다. 복부 신경절이 고정된 후 현미경의 배율을 25배로 높이면 신경절의 껍질을 벗기기 쉽다. 미세 핀셋으로 신경절의 껍질을 들어 올린 후 안에 있는 신경세포를 건드리지 않으면서 미세 가위로 신경절의 껍질을 제거한다. 신경절의 껍질 벗긴 후 micropipet(200μL적당)을 사용하여 찌꺼기를 빨아들여 배양용기를 깨끗하게 유지하는 것이 필요하다.

8) 온도 변화에 대한 안정 막전압의 측정

전기적인 신호를 측정하고 기록할 수 있는 컴퓨터가 연결된 해부 현미경을 사용한다. 미세 전극을 개군소 복부 신경절의 등쪽 오른쪽의 위치한 비교적 큰 silent cell에 찔러서 신경세포에서 나오는 전기적 신호를 증폭기에 연결된 디지털 오실로스코프를 통하여 확인한다. 그림 9 (a)는 개군소 복부 신경절에서 전기신호 측정의 목표로 잡은 silent cell의 위치를 개략적으로 보여준다 [19]. 해부 현미경 위쪽에 장착된 디지털 카메라로 찍은 개군소 복부 신경절의 신경세포 사

진이 그림 9 (b)이다. 화살표는 silent cell의 위치를 표시한다. 자동 온도조절장치를 이용하여 10-34℃ 범위에 해당하는 온도 구간에 대해서 온도를 1시간 동안 증가시키고 다음 1시간 동안 감소시킨다. 디지털 오실로스코프와 함께 BNC 케이블로 증폭기에 연결된 A/D 변환기(converter)를 통하여 입력된 신호를 Labview 프로그램을 사용하여 컴퓨터에 약 16시간동안 기록한다. 그리고 오리진(OriginPro 7.5)을 사용하여 시간(Time; 단위 min), 온도(T; 단위 ℃), 안정 막전압(V_r ; 단위 mV) 등을 좌표축으로 하는 그래프를 그린 후에 안정 막전압의 온도 의존성을 고찰한다.

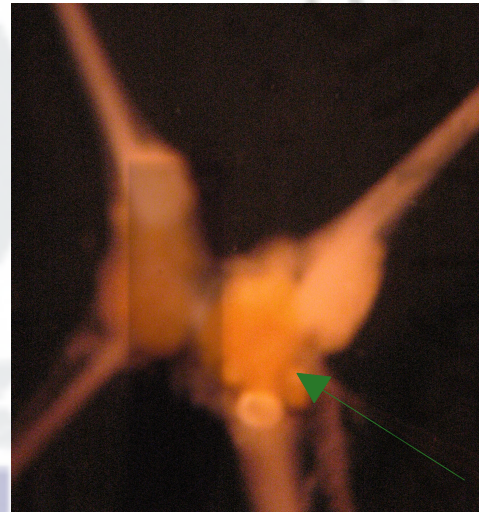
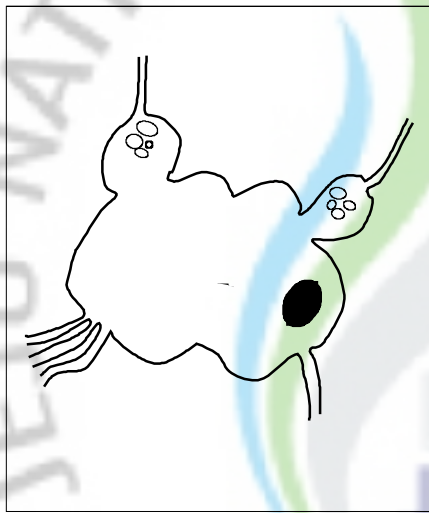


그림 9. 전기신호를 측정할 개군소 등쪽 복부신경절. (a) 전기신호를 측정할 silent cell의 위치에 대한 그림. (b) 전기신호를 측정할 silent cell의 위치에 대한 사진

IV. 결과 및 고찰

1. 보정 전 온도 변화에 대한 안정 막전압(V_r)의 그래프

개군소 복부 신경절의 신경세포 5개 즉 cell 1-5에 대하여 10-34°C 범위에 해당하는 온도 구간에 대해서 온도를 1시간 동안 증가시키고 다음 1시간 동안 감소시키는 자극을 주었다. 그때 각각 신경세포에 대하여 안정 막전압의 변화를 그래프로 나타낸 것이 그림 10-14이다. Cell 1-5는 개군소 복부 신경절의 등쪽 오른쪽에 있으며 온도가 변하더라도 항상 휴지 상태에 있는 silent cell만을 선택하였다. 그림 10-14의 그림 A는 측정 시간동안 온도 변화에 대하여 안정 막전압의 변화를 전체적으로 보여준다. 온도 변화는 (—)로, 안정 막전압의 변화는 (○)로 표시하였다. 그래프를 보면 온도가 올라갈 때 안정 막전압이 (-) 방향으로 커지고, 온도가 내려갈 때 안정 막전압이 작아지는 경향성을 보여주고 있다. 측정 시간에 대하여 5회 반복 패턴이 나타나는 것을 볼 수 있다. 각 그림 B는 온도와 안정 막전압값을 동시에 1초에 3000 sample 비율로 1분간 180000 sample을 컴퓨터에 저장된 text file들에 대하여 Origin으로 통계 처리한 자료를 토대로 하여 평균값과 표준편차($\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$, 여기서 n은 sample의 크기, \bar{X} 는 평균)를 함께 나타내도록 한 그림이다. 그림 10는 cell 1에 대한 실험 결과로서 그림 10 B를 보면 안정 막전압의 온도 의존성 경향이 분명하게 나타나고 있으며, 그림 11 B를 보면 cell 2에 대해서 온도가 낮을 때 표준편차가 크게 나타났으나 역시 온도 의존성이 있음을 알 수 있다. 그림 12 B를 보면 cell 3에서도 마찬가지로 온도 의존성을 확인할 수 있다. 그림 13 B를 보면 cell 4에 대해서, 그리고 그림 14 B를 보면 cell 5에 대해서 온도가 높을 때 표준편차가 크게 나타났으나 전반적으로 안정 막전압의 온도 의존성이 있음을 보여주고 있다.

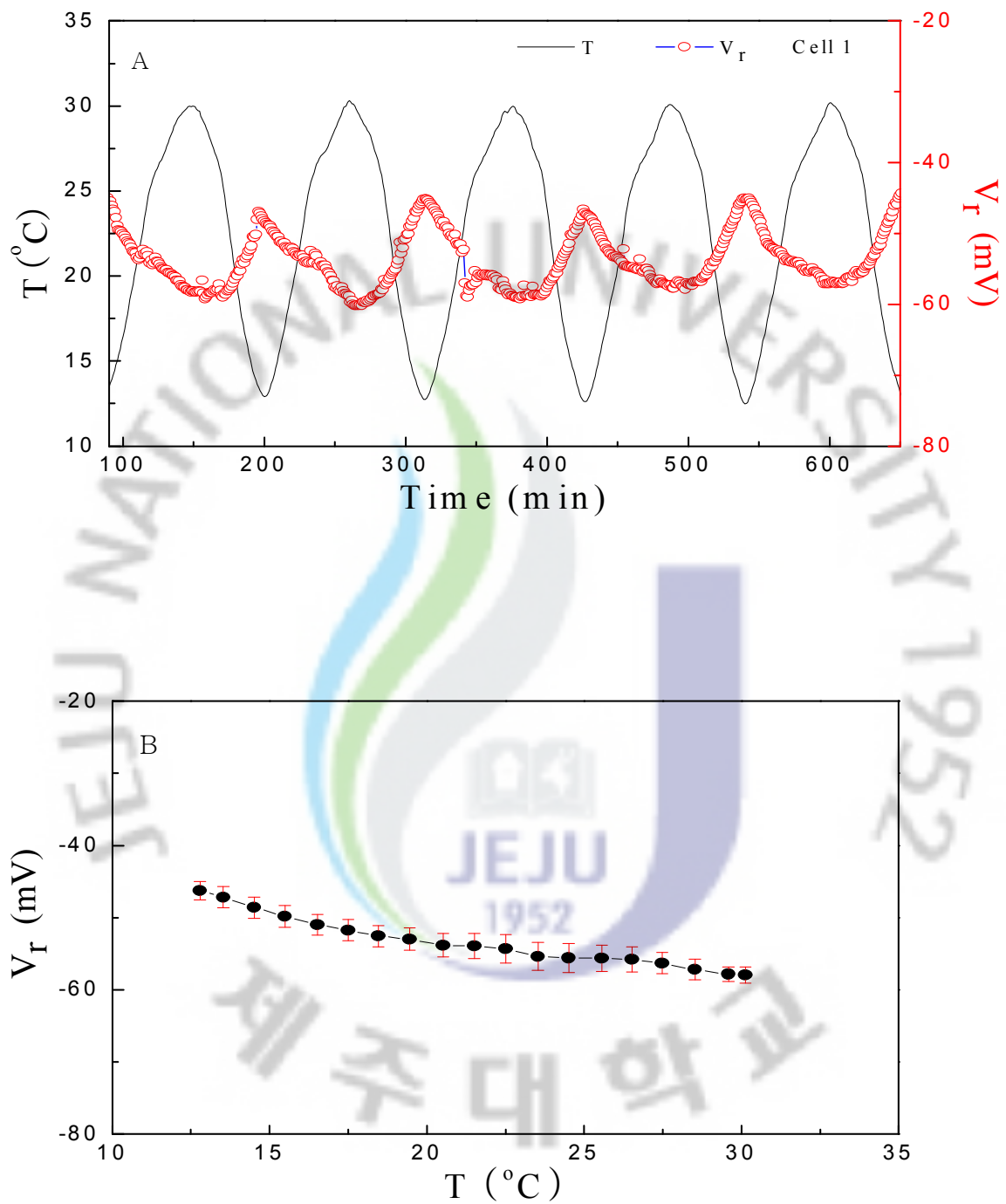


그림 10. 신경세포 1의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화. (A) 온도 변화 (—)에 따른 안정 막전압 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 안정 막전압의 온도에 대한 평균과 표준편차($\bar{V}_r \pm \sigma$)

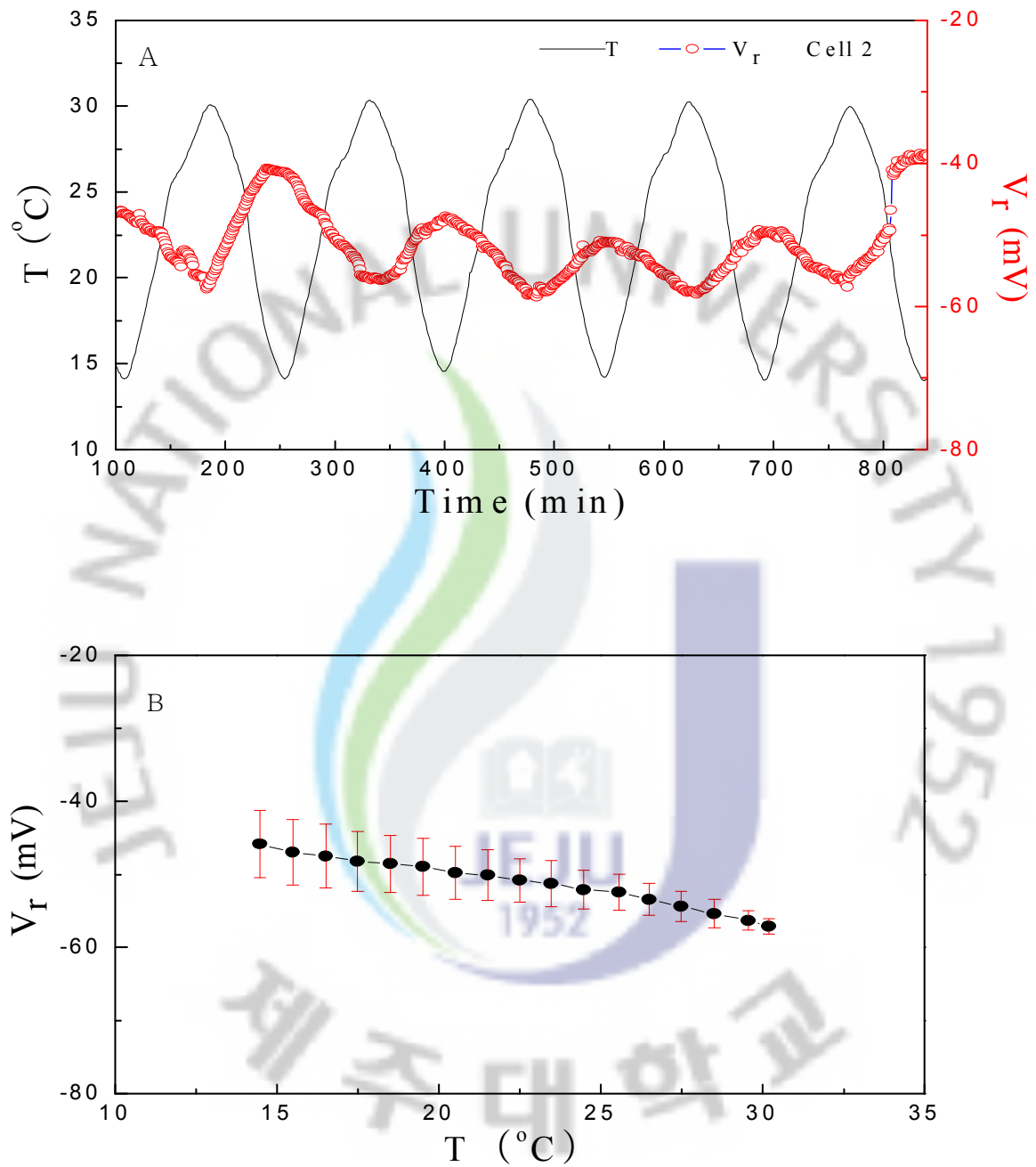


그림 11. 신경세포 2의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화. (A) 온도 변화 (—)에 따른 안정 막전압 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 안정 막전압의 온도에 대한 평균과 표준편차($\overline{V_r} \pm \sigma$)

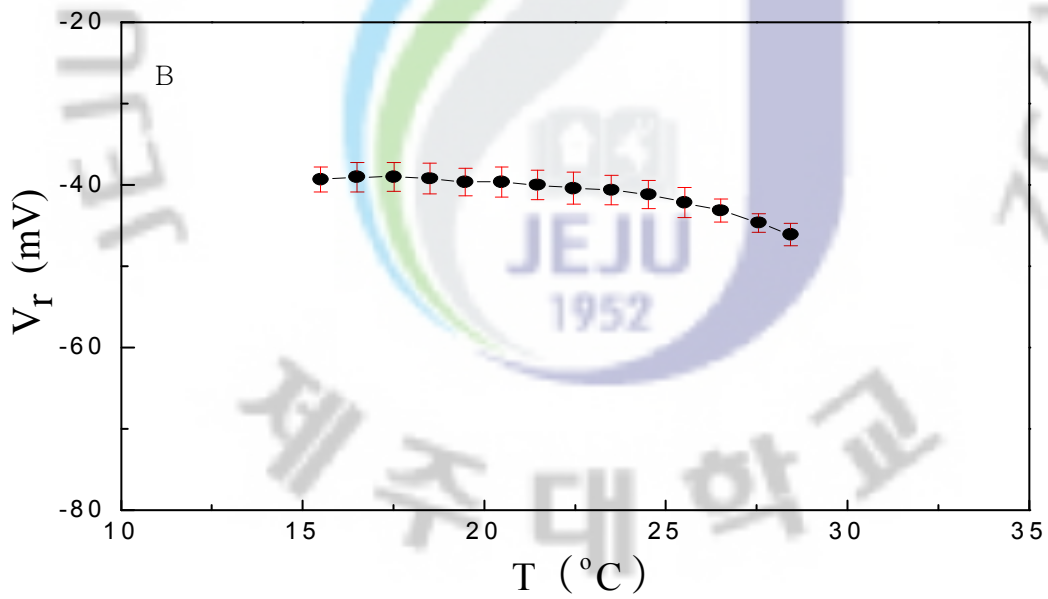
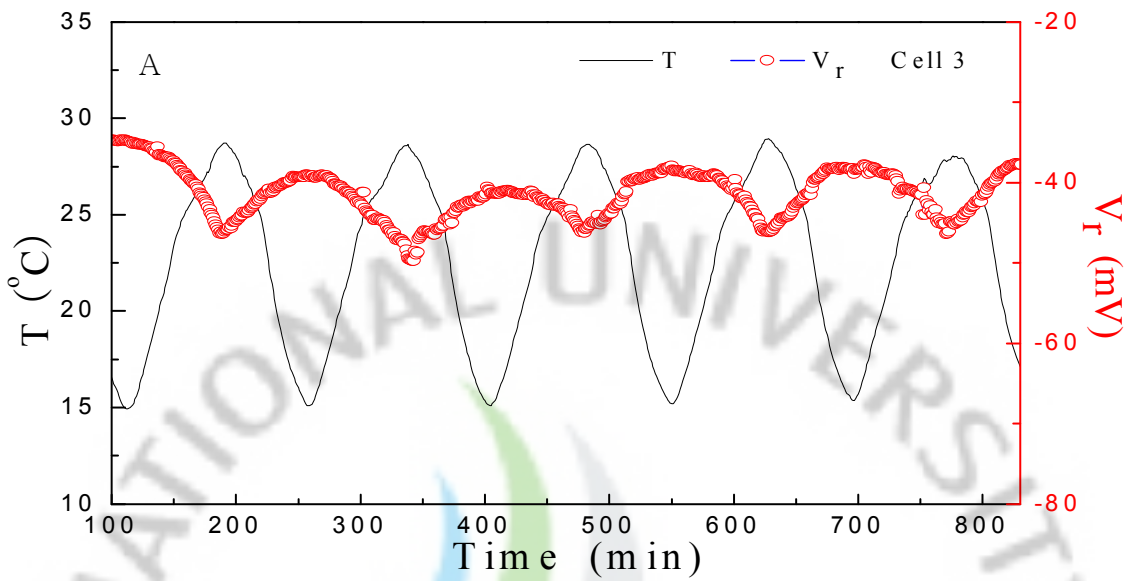


그림 12. 신경세포 3의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화. (A) 온도 변화 (—)에 따른 안정 막전압 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 안정 막전압의 온도에 대한 평균과 표준편차($\overline{V_r} \pm \sigma$)

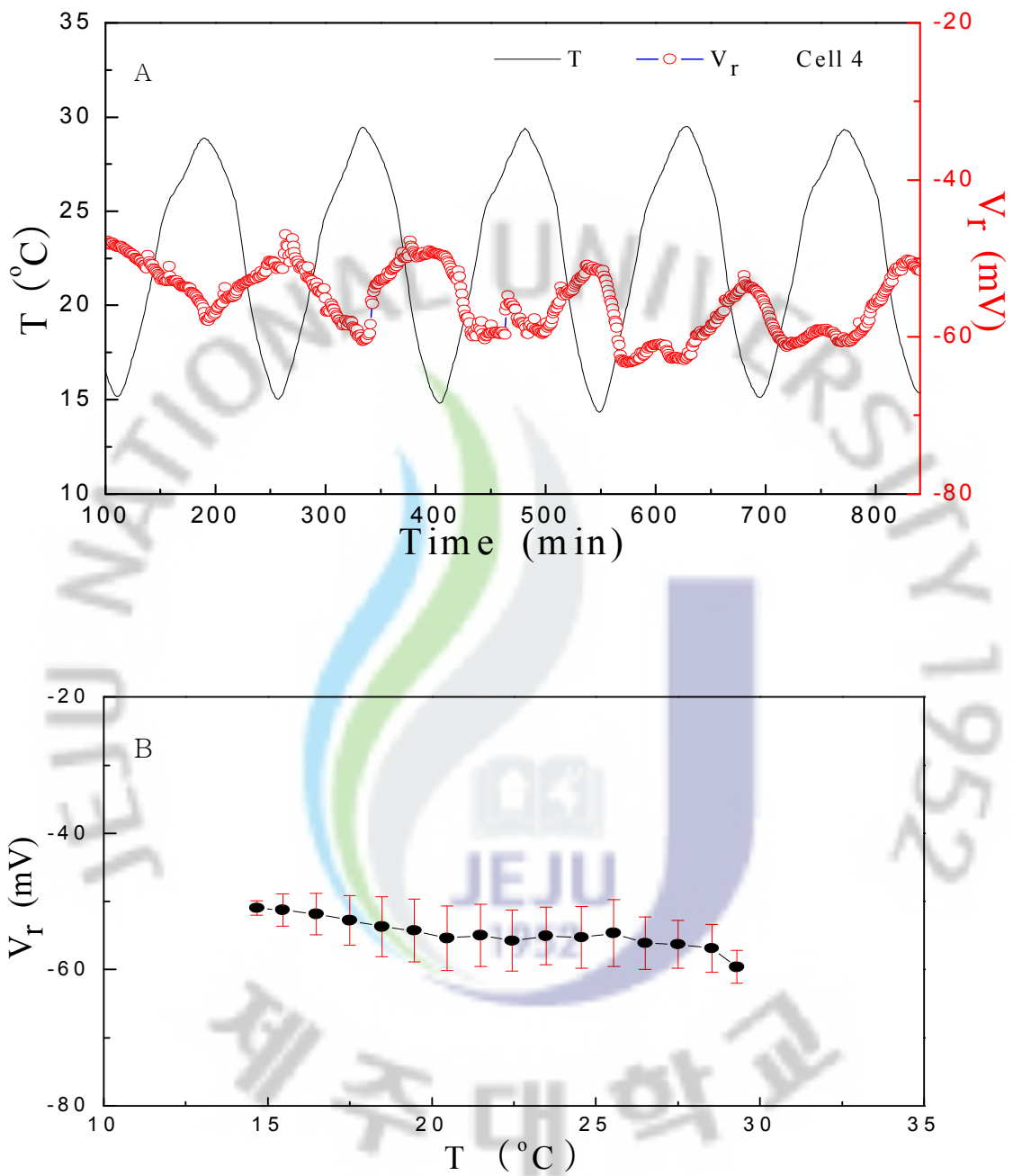


그림 13. 신경세포 4의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화. (A) 온도 변화 (—)에 따른 안정 막전압 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 안정 막전압의 온도에 대한 평균과 표준편차($\overline{V_r} \pm \sigma$)

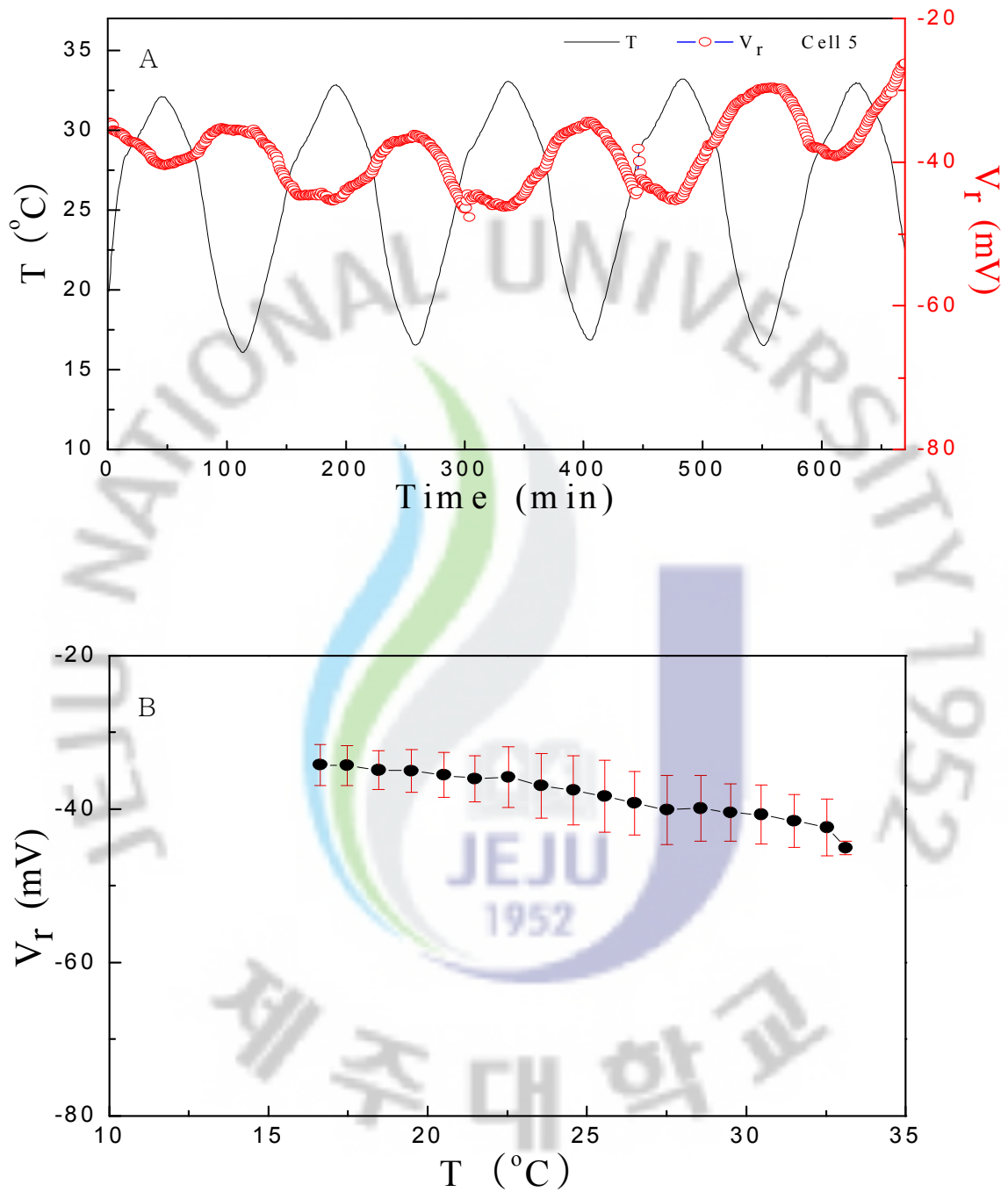


그림 14. 신경세포 5의 온도 변화에 대한 안정 막전압의 변화. (A) 온도 변화 (—)에 따른 안정 막전압 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 안정 막전압의 온도에 대한 평균과 표준편차($\bar{V}_r \pm \sigma$)

2. 온도 변화에 대한 L-15:ASW(1:1, v/v) 용액의 전위(V) 그래프

실험에 사용한 장비를 보정하기 위하여 개균소의 신경세포 없이 미디엄 즉, L-15:ASW(1:1, v/v) 용액만을 놓고 실험하였다. 신경세포와 동일한 온도 구간 즉 10-34℃ 범위에 해당하는 온도 범위에 대하여 온도를 1시간 동안 증가시키고 다음 1시간 동안 감소시켰다. 그때 각각의 L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 1-4에 대하여 온도 변화에 대한 전위의 변화를 나타낸 것이 그림 15-18이다.

그림 15-18의 각 그림 A는 측정 시간동안 온도 변화에 대하여 전위의 변화를 전체적으로 보여준다. 온도 변화는 (—)로, 전위의 변화는 (○)로 표시하였다. 그래프를 보면 온도가 올라갈 때 전위가 (-) 방향으로 커지고, 온도가 내려갈 때 전위가 작아지는 경향성을 보여주고 있다. 측정 시간에 대하여 5회 반복 패턴이 나타나도록 하였다. 각 그림 B는 온도와 안정 막전압값을 동시에 1초에 3,000 sample 비율로 1분간 180,000 sample을 컴퓨터에 저장된 text file들에 대하여 Origin으로 통계 처리한 자료를 토대로 하여 평균값과 표준편차를 함께 나타내도록 한 그림이다.

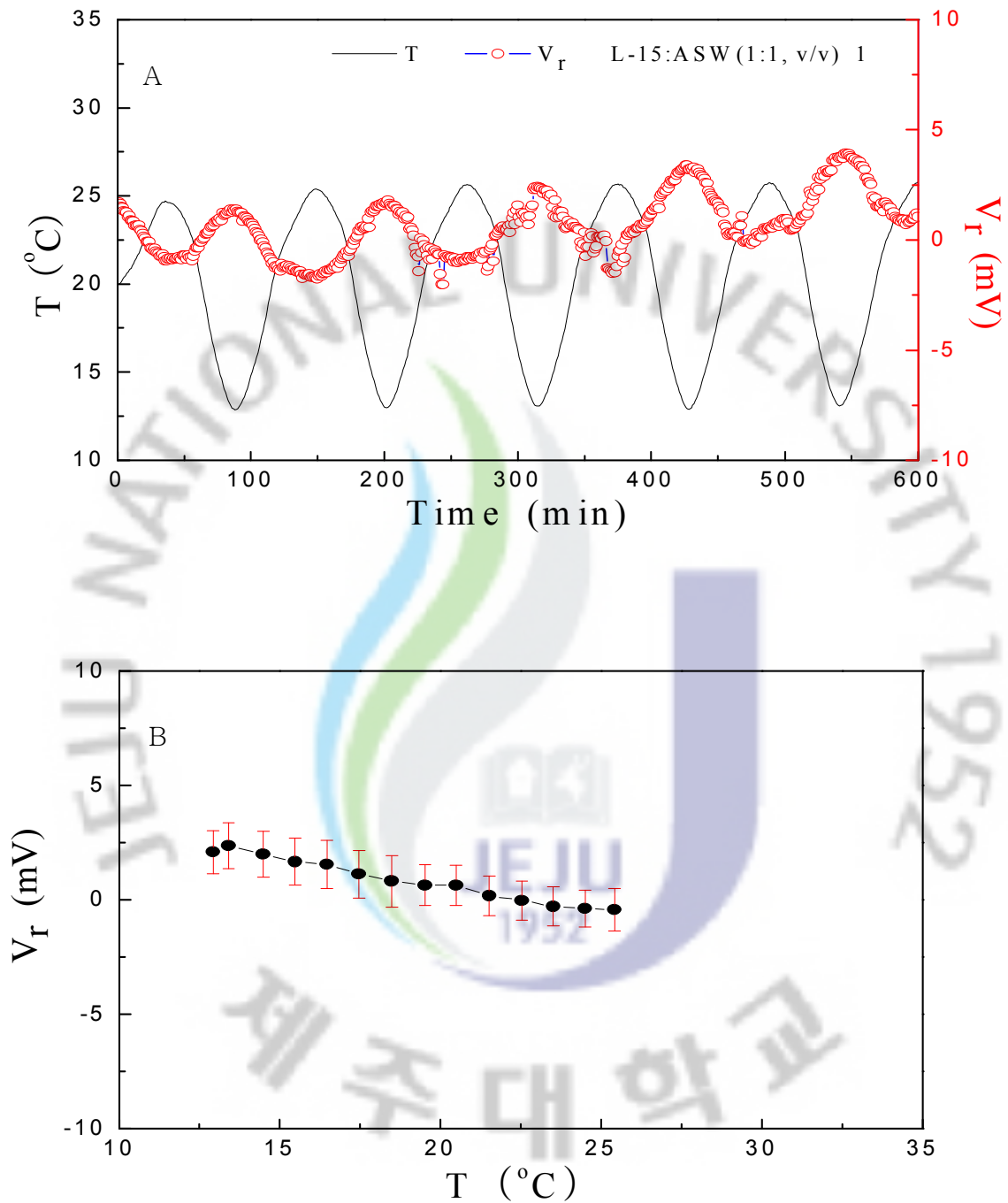


그림 15. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 1의 온도 변화에 대한 전위의 변화.
 (A) 온도 변화 (—)에 따른 전위 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한
 전위의 온도에 대한 평균과 표준편차($\bar{V} \pm \sigma$)

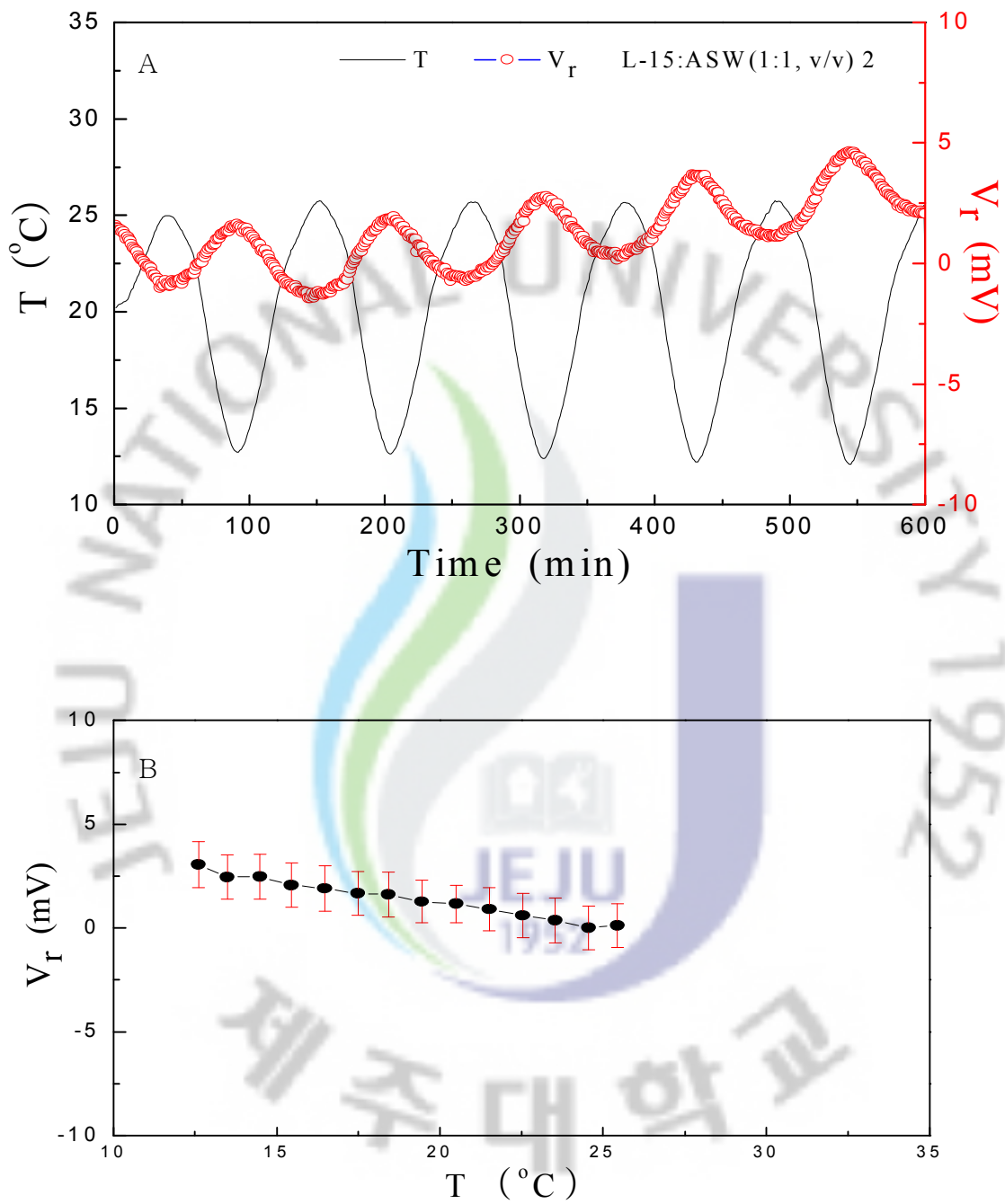


그림 16. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 2의 온도 변화에 대한 전위의 변화.
 (A) 온도 변화 (—)에 따른 전위 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 전위의 온도에 대한 평균과 표준편차($\bar{V} \pm \sigma$)

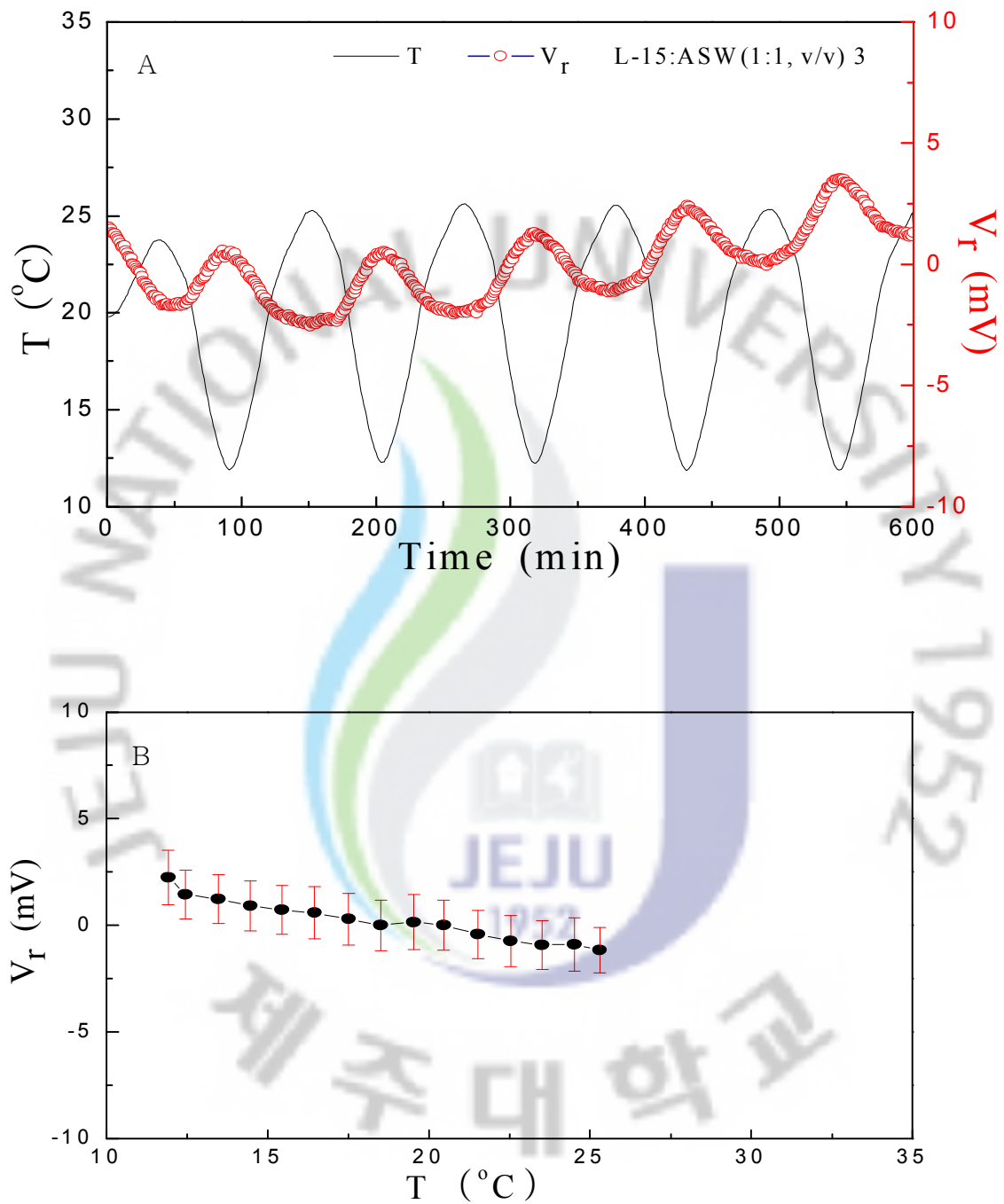


그림 17. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 3의 온도 변화에 대한 전위의 변화. (A) 온도 변화 (—)에 따른 전위 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 전위의 온도에 대한 평균과 표준편차($\bar{V} \pm \sigma$)

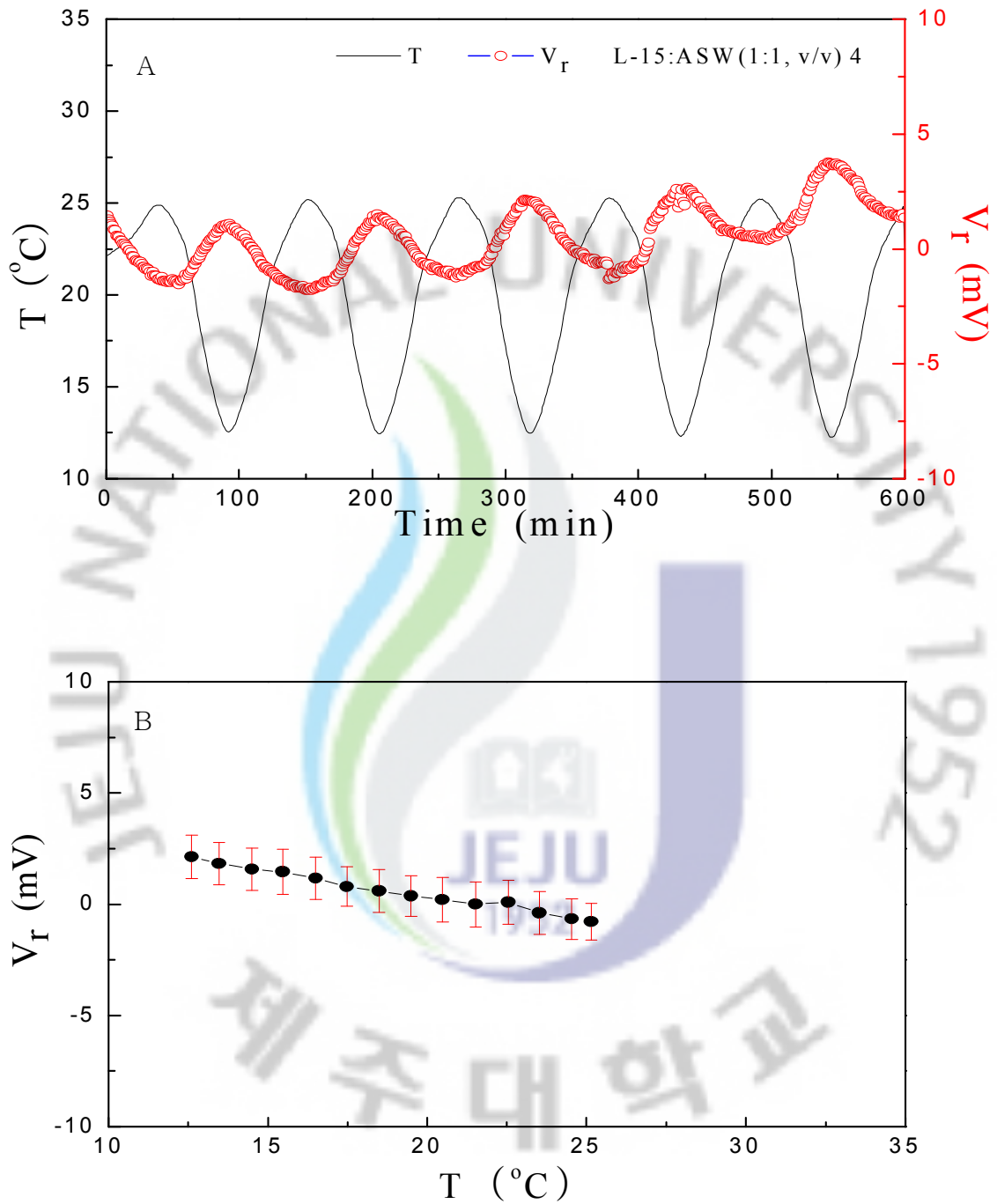


그림 18. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 4의 온도 변화에 대한 전위의 변화.
 (A) 온도 변화 (—)에 따른 전위 (○) 변화. (B) (A)의 data에 대한 전위의 온도에 대한 평균과 표준편차($\bar{V} \pm \sigma$)

3. 보정 후 온도 변화에 대한 안정 막전압(V_r)의 그래프

개균소 복부 신경절의 silent cell 1-5에서 온도 변화에 대한 각각의 안정 막전압 값의 범위가 서로 다르다. 그래서 cell 1을 기준으로 cell 2, 3, 4, 5의 안정 막전압 값을 보정한 평균 실험값(experimental V_r)을 그림 19 A에서 (●)으로 나타냈다. 실험 장비를 보정하기 위하여 L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 1-4를 평균한 보정값과 그 표준 오차를 그림 19 B에 나타냈으며, 그 보정값을 적용하여 실험값을 다시 보정한 평균 실험값(corrected experimental V_r)을 그림 19 A에서 (○)으로 나타냈다.

보정 과정을 표 3에 나타냈다. Cell 1-5은 온도 구간($T_{min} - T_{max}$)이 각각 달랐다. 그래서 10°C 온도 차이가 나는 공통된 온도 구간을 잡기 위하여 모두 16-26°C 온도 구간을 선택하였고, 그 온도 구간에 대하여 Cell 1-5 각각의 안정 막전압의 변화 범위($V_{min} - V_{max}$)를 나타냈다. 칸의 배경색을 어둡게 하여 강조하였다. Cell 1-5는 16-26°C 온도 구간에 대하여 안정 막전압의 변화 범위가 서로 다르다. 그래서 Cell 1의 안정 막전압의 변화 범위를 기준으로 하여 Cell 2-4 각각의 안정 막전압을 평행이동 방법으로 보정하였다. Cell 1-5를 평균한 보정 전 안정 막전압 값은 16-26°C 온도 구간에 대하여 -50 mV에서 -55 mV로 변화되었으며, 안정 막전압의 차 ΔV_r 은 5 mV로 계산되었다. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 1-4도 온도 범위가 각각 달랐기 때문에 10°C 온도 차이가 나는 공통된 온도 구간을 잡기 위하여 모두 15-25°C 온도 구간을 선택하였다. 또한 그 온도 구간에 대하여 L-15:ASW(1:1, v/v) 용액 1-4 각각의 전위 변화 범위를 나타냈다. 마찬가지로 칸의 배경색을 어둡게 하여 강조하였다. L-15:ASW(1:1, v/v) 용액의 평균값은 15-25°C 온도 구간, 즉 10°C ΔT 에 대하여 ΔV 가 1 mV였다. 이 값을 사용하여 Cell 1-5의 평균값을 보정한 값은 16-26°C 온도 구간에 대하여 -50 mV에서 -54 mV로 변화되었으며, 안정 막전압 차 ΔV_r 은 4 mV였다.

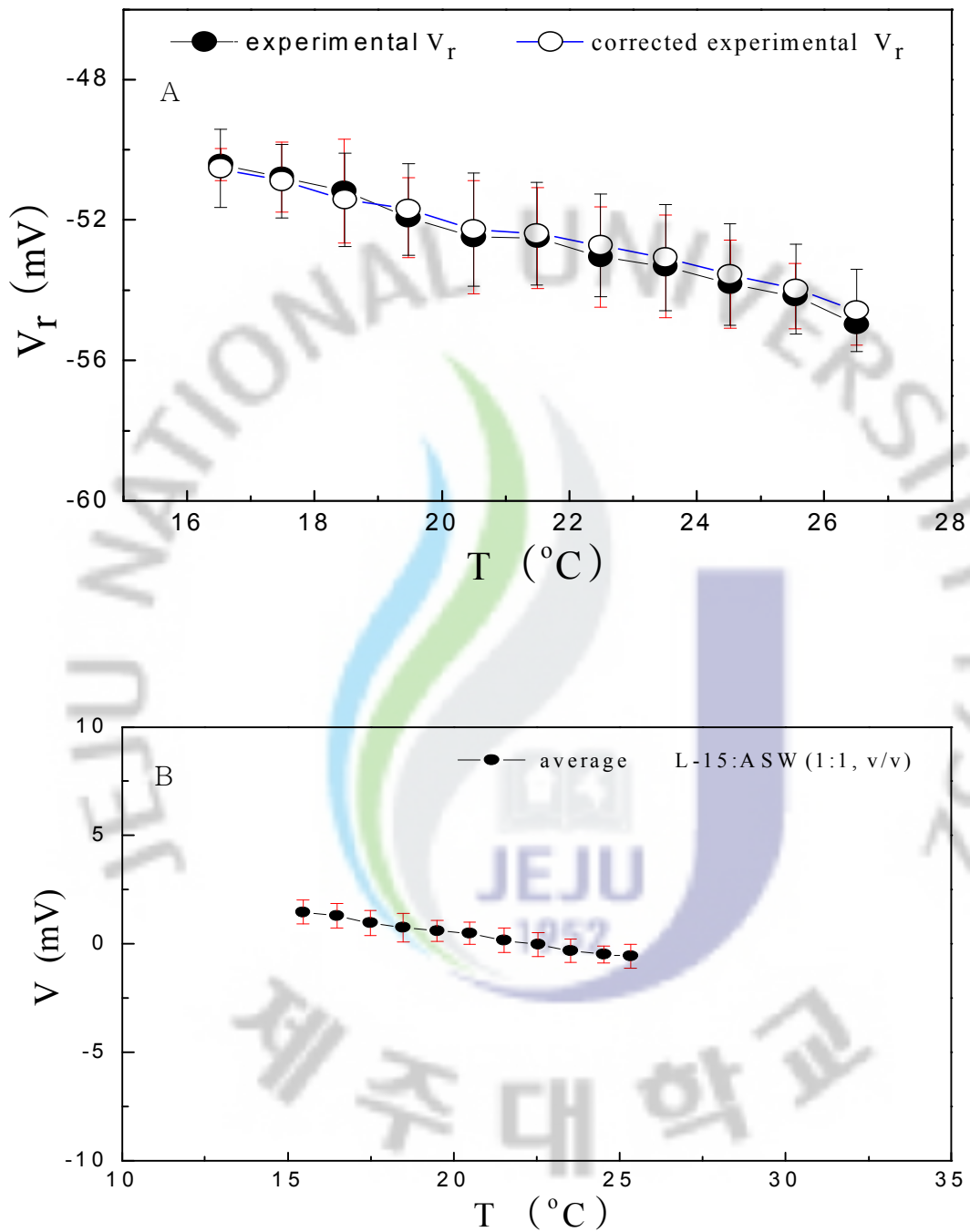


그림 19. 온도 변화에 대한 안정 막전압과 보정. (A) 5개의 cell에 대한 안정 막전압의 평균값(●)과 보정된 안정 막전압 값(○). (B) 4개의 L-15:ASW (1:1, v/v) media에 대한 V값의 온도 변화에 대한 평균값과 표준편차($\bar{V} \pm \sigma$)

표 3. 온도 변화에 대한 보정 전과 보정 후의 안정 막전압(V_r)

	온도 (T) $T_{\min} - T_{\max} (^{\circ}\text{C})$	안정 막전압 (V_r) $V_{\min} - V_{\max} (-mV)$	온도 (T) $\Delta T (^{\circ}\text{C})$	보정 전 $\Delta V_r (mV)$	보정 후 $\Delta V_r (mV)$
Cell 1	12 - 30	46 - 57	18	11	10
	16 - 26	50 - 55	10	5	4
Cell 2	14 - 30	47 - 57	16	10	8
	16 - 26	48 - 53	10	5	4
Cell 3	15 - 28	39 - 46	13	7	5
	16 - 26	39 - 43	10	4	3
Cell 4	14 - 29	50 - 59	15	9	8
	16 - 26	51 - 56	10	5	4
Cell 5	16 - 33	32 - 45	17	11	9
	16 - 26	32 - 36	10	5	4
L-15: ASW (1:1, v/v)	1	12 - 25	2 - 0	13	2
		15 - 25	1 - 0	10	1
	2	12 - 25	3 - 0	13	3
		15 - 25	2 - 0	10	2
	3	11 - 25	2 - (-1)	14	3
		15 - 25	0 - (-1)	10	1
	4	12 - 25	2 - 0	13	2
		15 - 25	1 - 0	10	1
	평균	15 - 25	1 - 0	10	1
	보정후 평균	16 - 26	50 - 54	10	5

*색깔이 있는 행의 data들은 통계 처리를 위하여 재구성한 data 들에 해당된다.

4. 실험값과 이론값 비교

온도 변화에 대하여 안정 막전압의 변화를 나타내는 실험값을 이론값에 비교하려고 한다. 이론값은 II장의 식 (23), 즉 GHK 방정식에 이온들의 세포 안과 밖의 농도값을 대입하여 계산할 수 있다. 복부 신경절 오른쪽의 큰 세포를 뽑아내서 세포 내의 이온 농도를 측정하려는 실험을 계획하였으나 측정하지는 못하였으므로 이온들의 세포 안의 농도값들을 알 수 없어서 식 (23)의 GHK 방정식을 직접 이용할 수 없다. 그래서 Lorenzo의 논문에 보고된 이론값과 본 연구의 실험값을 비교하였다. Lorenzo 논문에 보고된 이론값으로서의 안정 막전압 차 ΔV_r 은 2 mV였으며 [7], 본 연구의 실험값 ΔV_r 은 4 mV로 나타났다. 그리고 Lorenzo 논문에 보고된 실험값 ΔV_r 은 10-12 mV였으므로 본 연구의 실험값이 Lorenzo 논문의 데이터보다 이론값에 보다 더 가깝게 나타났다. 이론값과 실험값을 표 4에 나타내었다.

표 4. 안정 막전압의 실험값과 이론값 비교

	온도 (T) $T_{\min} - T_{\max} (^{\circ}\text{C})$	안정 막전압 (V_r) $V_{\min} - V_{\max} (-mV)$	온도 (T) $\Delta T (^{\circ}\text{C})$	$\Delta V_r (mV)$
Lorenzo 이론값	10-20	55-57	10	2
Lorenzo 실험값	10-20		10	10-12
본연구의 실험값	16-26	50-54	10	4

Lorenzo가 사용한 실험동물은 *Aplysia californica*이고, 본 연구의 실험동물은 *Aplysia juliana*이므로 실험동물의 종이 일치하지 않으며, 같은 조건에서의 실험이 아니므로 Lorenzo가 발표한 이론값과 이 실험값들을 직접 비교하는 것은 유의미하다고 할 수 없다. 그리고 아직 이 실험 결과를 바로 적용시킬 수 있는 방

정식은 알려져 있지 않으므로 현재로서는 방정식에 의거한 정확한 이론값을 계산할 수는 없다. 그렇지만 생물물리학 실험 연구결과는 이론값과 비교하는 것이 바람직하다고 생각하기 때문에, 본 연구의 실험결과와 대비할 수 있는 유사한 종의 실험 논문에서 발표한 이론값을 이 실험 결과와 비교함으로써 장차 이 분야의 연구에 다소 참고가 될 수 있도록 하였다.

그림 20에서 안정 막전압의 보정된 평균 실험값(correction experimental) V_r 은 (●)으로, Lorenzo의 논문에 보고된 이론값(theoretical) V_r 은 (○)으로 표시하여 기울기를 비교하였다. 정성적인 비교를 하기 위해서 16°C에서 실험값과 이론값을 일치시킨 다음에 그림을 그렸다. 온도가 증가할 때 안정 막전압의 절대값이 증가하는 경향을 분명하게 보여 준다.

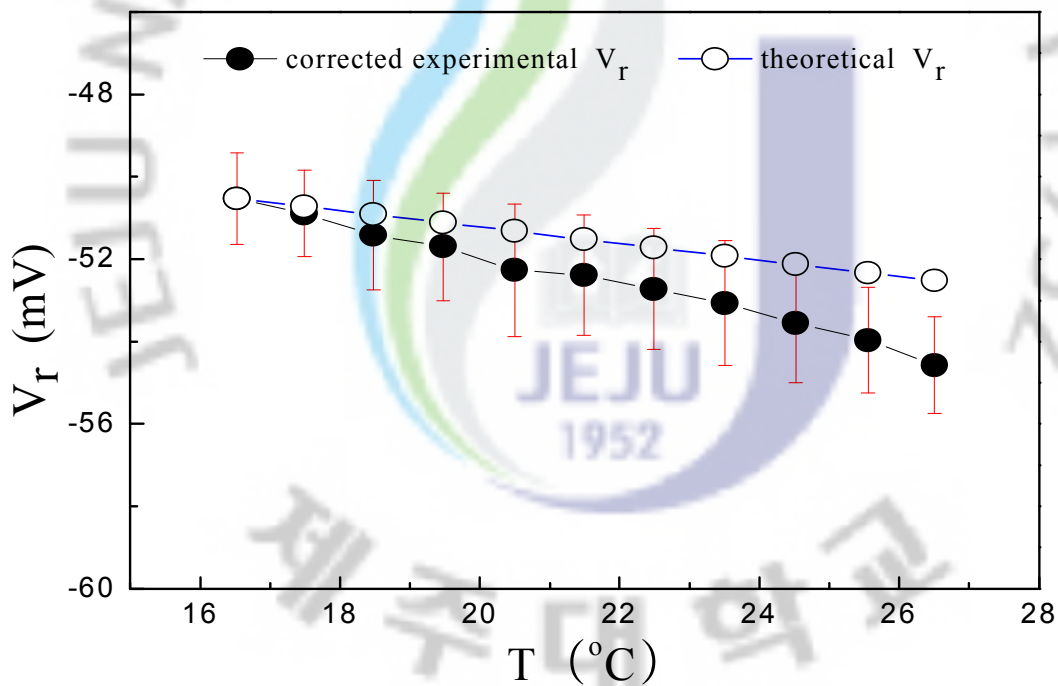


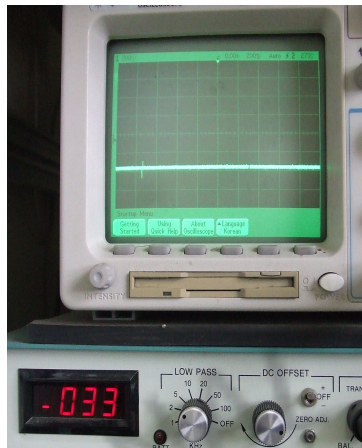
그림 20. 온도 변화에 대한 안정 막전압의 실험값과 이론값 비교
*실험값(●)과 이론값(○)을 비교하였다. 그러나 이 이론값들은 세포내의 각 이온 농도를 측정하지 않았기 때문에 편의상 나타냈을 뿐이지 실험값과 직접 비교가능하지 않은 값들이다.

5. 고찰

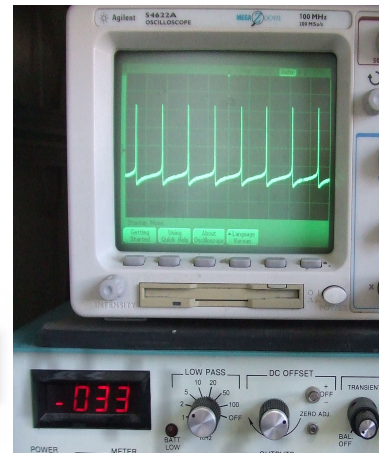
긴 시간 동안 온도 의존성에 대한 재현성을 보일 수 있는 실험동물로 적합한 개군소(*Aplysia juliana*)를 사용하여 실험하였다. 군소는 직경이 $70\mu\text{m}$ 정도 되는 큰 신경 세포들을 가지고 있으므로 해부 현미경으로 관찰이 되고 실험 조작이 비교적 쉬웠다. 개군소의 복부 신경절 등쪽의 오른 쪽에 위치한 비교적 큰 silent cell 만을 선택하였다. 왜냐하면 온도가 변하더라도 오랫동안 활동전위를 일으키지 않는 silent cell은 beating, bursting, chaotic cell의 온도 효과에 대한 영향을 연구하는데 중요한 토대가 되는 신경세포였기 때문이다.

제주 해녀가 잡은 개군소를 실험동물로 사용하여 수족관에서 키우며 실험하였다. 필요한 실험 기구와 재료를 준비한 후에 개군소를 해부하고 전기 신호를 측정하였다. *Aplysia juliana*는 *Aplysia californica*와 구조가 비슷하나 silent cell의 위치가 조금씩 달랐다. 미세 전극은 아주 작은 진동에도 신경세포로부터 떨어지는 경우가 생기기 때문에 진동을 제어하는 장치가 반드시 필요했다. 또한 3M KCl를 넣은 미세전극 안에 기포가 생기지 않도록 주의해야만 전기 신호를 잘 측정할 수 있었다. 신경 세포에 미세 전극을 찌를 때에 단 한 번에 찌러야 신호가 잘 나온다. 여러 번 찌르면 신호가 잘 나타나지 않았다.

10-34°C 범위에 해당하는 온도 구간에 대해서 온도를 1시간 동안 증가시키고 다음 1시간 동안 감소시키는 온도의 변화를 유도하면 silent cell의 전기 신호는 디지털 오실로스코프의 모니터에서 일직선 모양으로 유지되며, 증폭기의 창에 나타나는 막 전위는 조금씩 변화를 보였다. 그림 21 (a)는 silent cell의 전기 신호가 디지털 오실로스코프(digital oscilloscope)에서 일직선으로 나타남을 보여주고 있다. 즉, 활동 전위가 나타나지 않는다. Silent cell과 비교하기 위하여 활동전위가 나타나는 beating cell의 전기신호를 그림 21 (b)에 나타냈다. 디지털 오실로스코프 아래 증폭기의 창에 나타난 빨간 숫자는 신경세포의 막전압값을 표시한다.



(a)



(b)

그림 21. 모니터에 나타난 신경세포의 전기 신호. (a) silent cell의 전기 신호. (b) 활동 전위가 나타나는 beating cell

안정 막전압을 16시간동안 컴퓨터에 기록하고, 다시 기록된 많은 양의 데이터를 바탕으로 오리지널을 이용하여 분석하였다. 결과적으로 안정 막전압의 온도 의존성이 정량적으로 분석되었다. 장시간의 데이터는 온도 의존성을 재현하기에 충분하였다. 실험 장치가 가지고 있는 보정값을 고려하여 보정된 실험값은 평균과 표준편차를 포함하더라도 안정 막전압의 온도 의존성 경향을 분명하게 보여주었다.

GHK 방정식을 사용하여 안정 막전압의 이론값을 계산해야 하는 것이 최선이지만, silent cell 내부의 이온 종류와 농도를 정확히 측정하는 실험을 하지 못하였기 때문에 GHK 방정식을 사용하여 이론값을 계산할 수 없었다. 현재로서는 이 실험 결과를 정확히 설명할 수 있는 방정식은 없으므로, Lorenzo가 발표한 이론값과 실험값을 본 연구의 실험값과 대비하였다.

이때, 온도가 증가함에 따라 안정 막전압이 과분극되는 현상을 고찰할 목적으로 세포내의 각각의 이온 농도가 같은 비율로 변할 때를 가정하여 고찰한 GHK 방정식인 II장의 식 (27)을 사용하여 보자. 16-26°C 온도 구간에 대한 안정 막전압 차 ΔV_r 를 계산하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned}
\Delta V_r &= V_r(26^\circ\text{C}) - V_r(16^\circ\text{C}) \\
&= RT/F(26^\circ\text{C}) \delta - RT/F(16^\circ\text{C}) \delta \\
&\approx (59.4 - 57.4) \delta = 2 \delta \text{ mV} .
\end{aligned}
\tag{28}$$

식 (28)에서 만일 $\delta = 1$ 인 경우에 ΔV_r 은 약 2 mV가 된다. 이 이론값은 Lorenzo의 논문에 보고된 이론값 2 mV와 거의 일치하게 된다. K^+ 이온의 평형전압이 안정 막전압과 거의 같으며 [7, 12, 20], 과분극 현상이 일어날 때 K^+ 이 세포 밖으로 더 많이 유출된다 [21, 22]. 과분극으로 인해 생기는 기전력은 Ca^{2+} 이 세포 안으로 유입되는 것을 촉진시킨다 [22, 23]. 다시 말해서 GHK 방정식에 K^+ , Na^+ , Cl^- 의 세포 안과 밖의 농도값만을 대입하여 안정막 전압의 이론값을 계산하면 실제 실험에서 나타나는 안정 막전압 값과 차이가 생기는 것은 당연하다. 안정 막전압에 대한 이론값이 실험값과 일치하기 위해서는 K^+ , Na^+ , Cl^- 이외에도 다른 모든 이온들의 세포 안과 밖의 농도 분포를 모두 고려해야만 한다. 이론값과 실험값의 실험오차를 좀 더 줄이고, 각 이온들의 온도에 따른 농도 변화를 반영시킬 수 있는 방정식을 만드는 것이 필요하다.

V. 결론

본 연구는 개군소(*Aplysia juliana*)를 실험동물로 사용하였고, 온도가 변화더라도 활동 전위를 일으키지 않고 휴지상태를 유지하는 신경세포, 즉 silent cell만을 선택하여 실험하고 16시간동안의 데이터를 저장하여 분석하였다. 개군소를 실험동물로 사용할 때에 최대 30-60시간 동안 측정된 데이터를 얻을 수 있어서 재현성을 보이는 연구에 매우 용이하다. 한 번 실험을 할 때 약 5G바이트 정도의 많은 데이터 양을 얻었다. 안정 막전압을 변화시키는 온도 변화의 효과를 2시간을 주기로 5회 관찰함으로써 온도 의존성의 재현성을 알아보는 연구의 목적을 이루었다. 연구에 사용한 실험 장비는 온도를 변화시키는 경우에 실험값을 보정해야 했다. 실험 장비 자체가 가지고 있는 보정 값을 알아보기 위하여 신경세포 없이 미디어(media)만 놓고 실험을 추가적으로 하였다. 평균값과 표준 오차를 포함한 데이터를 분석하더라도 온도에 의존함을 분명하게 보이는 안정 막전압의 기울기를 확인할 수 있었다. 온도가 증가하면 안정 막전압(V_r)도 증가하였다. 즉, K^+ 이온이 세포 밖으로 더 많이 유출되는 과분극 현상으로 이행되었다고 설명할 수 있다.

실험 환경상 GHK 방정식을 직접 이용하여 이론값을 계산할 수 없으므로 Lorenzo의 선행연구와 비교하였다. Lorenzo의 이론값인 안정 막전압 차 ΔV_r 은 10-20°C 온도 구간에 대하여 2 mV 이고, 실험값 ΔV_r 은 10-12 mV로 보고되었다 [7]. 본 연구의 실험값은 16-26°C 온도 구간에 대하여 ΔV_r 이 4 mV로 나타났다. 그러므로 평균값과 표준편차를 포함하더라도 본 연구의 실험이 Lorenzo의 실험보다 실험 오차가 더 작게 나타났다.

장시간의 측정과 상당한 양의 데이터 분석을 통하여 silent cell이 온도 의존성의 경향을 나타냄을 보였다. 이 연구 결과는 *Aplysia*의 beating, bursting, 혼합형 (chaotic) cell 등의 신호를 내는 신경 세포의 온도 변화에 대한 반응의 경향성을 연구하는 데 중요한 토대가 될 것이다.

<참고 문헌>

- [1] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley and B. Katz, J. Physiol. **116**, 424-448 (1952).
- [2] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Physiol. **116**, 449-472 (1952).
- [3] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Physiol. **117**: 500-544 (1952).
- [4] A. L. Hodgkin, B. Katz, J. Physiol. **109**, 240-249 (1949).
- [5] David O. Carpenter, J. Physiol. **50**, 1469-1484 (1967).
- [6] Seishi Hakozi, Mitsuhiro Matsumoto and Kazuhiko Sasaki, Japanese J. Physiol. **39**, 115-130 (1989).
- [7] P. Lorenzo Marchiafava, Comp. Biochem. Physiol. **34**, 847-852 (1970).
- [8] 정도영, 참군소 신경세포의 배양 방법에 관한 연구 (1996).
- [9] 양병환 외 11명, 기억, 하나의학사, 213-215 (2001).
- [10] Chae-Seok Lim, Do Young Chung and Bong-Kiun Kaang, Mol. Cells, **7**(3), 399-407 (1997).
- [11] Richard W. Murray, comp. Biochem. Physiol. **18**, 291-303 (1966).
- [12] 함기선, 신문균, 최홍식, 신경생리학, 현문사, 28 (1997).
- [13] Daniel Johnston and Samuel Miao-Sin Wu, *Foundations of Cellular Neurophysiology*, A Bradford Book, The MIT Press, 9-32 (1955).
- [14] Charles Kittel, *Introduction to Solid State Physics*, 2/e, 240 (1953).
- [15] Nam Gyu Hyun, Yong-Joo Kim, Won-Taek Kim, J. of Basic Sciences, Jeju Nat'l Univ. **18**(2), 106 (2005).
- [16] Phys539: *Introduction to Biological Physics*, www.jhu.edu/motn.
- [17] Bertil Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3/e, Sinauer Associate Inc., Sunderland, MA, 16 (2001).
- [18] 현남규, 마음과 신경, 제주대학교출판부, 185-187 (2007).
- [19] Eric R. Kandel, *Cellular Basis of Behavior*, W. H. Freeman Co. New York, 227 (1976).

- [20] Seong-geun Hong, Ik-hyen Kim, Young-deok Cho, Korean J. Vet. Sci. **31**(1), 33-40 (1991).
- [21] John R. Clay, *Determining K^+ channel activation curves from K^+ channel currents often requires the Goldman-Hodgkin-Katz equation*, Frontiers in Cellular Neurosci. **3**(20) (2009).
- [22] 박재용, *계배 근원세포의 K_{Ca} channel의 활성화에 따른 막전위 과분극의 역할* (1997).
- [23] R. W. Meech, *Calcium influx induces a post-tetanic hyperpolarization in Aplysia neurones*, Comparative Biochem. & Physiol. Part A: Physiol. **48**(2), 387-395 (1974).

