

주사전자현미경에서 Immunolabing의 적용

김수진 (한림대학교 생물학과)

주사전자현미경은 물체의 절단면 미세구조를 관찰하기 위한 목적에서 제작된 현미경이다. 따라서 관찰하기 위한 과정은 무생물 즉 유기물이나 금속의 경우는 금속입자를 鍍金하여 관찰하거나 아니면 금속의 경우 직접 관찰하고, 생물체의 경우는 고정, 탈수, 건조, 鍍金 그리고 관찰하는 것이 일반적으로 사용되어 왔다.

그러나 1970년대 말부터 전자현미경의 생물시료에 면역항체를 이용하여 금속입자를 표지하고 단백질의 세포내 존재와 분포 및 이동경로를 확인하는 방법이 개발되어 투과전자현미경에 적용되어 왔다. 1980년대 부터 주사전자현미경에도 이방법이 적용되어 세포의 표면에 물질의 존재와 분포 및 이동경로를 확인하는 방법으로 현재 많이 사용되고 있다.

특히 최근에는 세포배양기술이 발달되면서 배양세포의 표면미세구조의 관찰에 쉽게 적용시킬 수 있으므로 많은 연구자들이 면역표지법에 특히 관심이 있다. 따라서 많은 연구자들이 SEM의 Immunolabing technique을 적용시키고 있는 것으로 알고 있다. 혹자들은 SEM과 TEM의 Immunolabing technique을 Immunoelectron Microscopy로 사용하기도 하고 심한 경우에는 면역전자현미경학이라고 까지 할 정도가 되었다. 그러나 본인의 생각으로는 전자현미경의 관찰에서 한 가지 방법에 불과한 것을 전공학문으로 승격함은 다소 무지한 표현으로 여겨지며 Immunoelectron Microscopic technique (method) 혹은 Electron Microscopic Immunolabing technique (method)으로 사용함이 정확할 것으로 생각한다.

아무튼 주사전자현미경 면역표지법은 현재까지 사용되어왔던 면역반응, 고정, 탈수, 건조 및 도금을 적절히 시도해야 하므로 다음과 같은 시약으로 시료의 처리과정을 사용함이 적절할 것으로 생각 된다.

1. 표지에 사용되는 시약

1) 0.12 M cacodylate buffer(pH 7.4)에서 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde

2) 0.12 M cacodylate buffer(pH 7.4)에서 2% osmium tetroxide 고정액

3) 50nm protein A gold particle

A. Colloidal gold solution

D.D.H₂O 79ml

1% H₂AuCl₄ in H₂O 1ml

1% tri-sodium citrate 2H₂O 5ml

1% tannic acid 0.005ml

25mM K₂CO₃ 0.005ml

final volume 100ml by H₂O on the hot plate(60°C).

while stirring. Boiling until red color appear.

B. Protein A-gold complex

Colloidal gold solution 100ml

Protain A solution(2mg/ml) 1ml

10,000g 정도의 원심분리로 분리시켜 사용

4) 2차항체 반응 산도에 대한 비교표

Protein pH

Immunoglobulins(IgG fraction, affinity-purified antibody, 9.0(7.6-8.2) monoclonal antibodies)

F(ab₁)₂ 7.2

Protain A and G 5.9-6.2

Ricinus communis lectin I and II 8.0

Peanut lectin 6.3

Helix pomatia lectin 7.4

soybean lectin 6.1

lens cularis lectin 6.9

Bandeirea ismplicifolia lectin 6.2

Mannan from candida utilis or sacharomyces cerevisae 7.0

Horseradish peroxidase 7.2-8.0

Ovomucoid 4.8

Ceruloplasmin 7.0

Asialofetuin 6.0-6.5

Galactosyl bovine serum albumin 6.0-6.5

Bovine serum albumin 5.2-5.5

Peptide-bovine serum albumin conjugates 4.0-4.5

Insulin-bovine serum albumin conjugates 5.3

Chokera toxin and Tetanus toxin 6.9

DNA ase 6.0

RNA ase 9.0-9.2

Low density lipoprotein 5.5

α 2-macroglobulin 6.5

Avidin(unmodified, egg white) 10.0-10.6

Avidin(tetramethyrhodamine isothio-cyanate, egg white 6.4-6.6

avidin(Steptavidin)

2. IMMUN SEM을 위한 과정

1) 면역반응

배양세포 혹은 조직세포를 세척용 완충용액으로 세척을 하고 2차면역항체에 따라 완충용액의 pH를 다르게하여 세척한다.

37도의 온도에서 1차 면역항체와 1시간 반응 시킨다.

4도의 온도에서 5분씩 3회 세척용 완충용액으로 세척.

20도의 온도에서 2차면역항체와 1시간 반응.

4도의 온도에서 5분씩 3회 세척용 완충용액으로 세척.

2) 시료의 고정

20도의 온도에서 1차고정액으로 5분 고정한 다음 4도의 온도에서 2시간 고정한다.

4도의 온도에서 5분씩 3회 세척용 완충용액으로 세척

4도의 온도에서 2차 고정액으로 1시간 고정한다.

4도의 온도에서 5분씩 3회 세척용 완충용액으로 세척하여 탈수 한다.

3) 탈수

탈수에서 aceone을 사용할때는 배양세포의 겨우 배양용기가 aceone에 녹지 않는 것을 사용하거나 배양세포를 배양용기에서 탈락시켜 원심분리하여 사용함이 이상적이다.

4) 건조

조직세포는 일반적인 방법으로 건조시킬 수 있으나 배양세포의 경우에는 거름종이에 포장하여 건조시키는 것이 효율적이다.

* 건조과정에서도 시료의 변형을 최소로 줄여야하며 시료의 성질에 따라서 air drying, vacuum freeze drying, critical point dry 등의 방법을 선택하여 시행하는 것이 좋다.

5) 시료대에 부착

조직혹은 배양세포를 시료대(specimen stub)에 고정(mounting) 시킬때에는 접착제를 사용하는 것 보다 시료대 부착용 탄소 양면tape등을 사용하는 것이 효율적이다.

6) 도금(Coating)

일반적으로 많이 사용하는 RMC-Eiko Corp.Ion Coater 등을 사용함이 무난하다.

7) 현미경관찰후 사진은 사진입자의 선명도를 유의하여야 표지된 금속입자의 확인이 명확해진다.