

면역전자현미경법 (Immuno Electron Microscopy)

이계일 (중앙대학교 의과대학 전자현미경실)

개 요

면역전자현미경법의 원리는 광학현미경의 면역조직화학법과 마찬가지로 조직 세포내의 항원성을 가지고 있는 물질의 국재(localization)를 이것과 특이적으로 반응하는 항체에 전자현미경으로 관찰 가능한 물질을 표지하여 이 표지 항체를 조직 절편이나 세포에 반응시켜 그 결합부위를 관찰하는 방법이다. 항원의 국재(localization)를 증명하는 방법은 면역조직화학적 기법의 개발과 전자현미경의 개량에 병행하여 발달하여 왔다. 즉, 단세포군 항체(monoclonal)의 개발, 주사전자현미경의 개량과 그밖에 다른 분야의 진보를 이용하면서 20년 사이에 눈부신 발전을 이루었다.

이 장에서는 표지 항체와 표본 제작법을 중심으로 기술하고자 한다.

면역전자현미경의 목적

면역전자현미경을 포함한 면역조직화학의 목적은 관찰하려고 하는 항원 물질의 국재를 그것이 존재하는 조직세포의 구조와 밀접한 관련하에서 파악하려는 데 있다.

이것을 위한 조건으로는 1)세포의 구조를 가능한 한 그대로의 모습으로 보존해야 하며 2)항원을 그 국재하는 장소로부터 이동하거나 유실(washout)되는 것을 방지하고, 항원성을 상실하지 않도록 해야 하며 3)항원의 국재를 나타내는 표지물이 장기간 안정(stable)하게 관찰될 수 있는 것이 중요하다.

표 지 (labelling)

1.ferritin표지 항체 (ferritin labeled antibody)

Ferritin은 분자량이 약 650,000으로 그 중의 25%가 철이며, 전자현미경으로 관찰 가능하다는 것이 Farrant(1954)에 의해 보고되었고, Singer(1959)에 의하여 항체의 표기로 면역전자현미경에 사용되었다.

1) Singer & Schick법(1961) : toluene 2,4-diisocyanate가 pH7.5에서는 한쪽만이 단백질과 결합반응을 하고, 이어서 pH 9.5로 항체와 반응시키는 방법을 고안해 냈다. 이 방법은 2종의 단백질에 각 단백질끼리의 결합을 피하여 특이적으로 결합하는 것이 특징이다.

2) Ram 법 (1963) : p,p'-difluoro-m, m'dinitrodiphenyl sulfone을 이용하여 효율이 좋은

ferritin과 항체를 결합시키는 방법이다. 이 ferritin표지 항체는 세포막 표면의 항원 국제 증명에 공헌하였다.

단점 : ferritin표지 항체가 너무 커서 세포나 조직내에는 침투하지 않기 때문에 수지 포매된 조직의 초박절편상으로 항원의 국제를 시도하였으나, ferritin표지 항체는 수지와 강한 친화성이 있어 이 표지의 이용은 한때 이용되지 못하였다. 그러나 Tokuyasu(1973)에 의해 동결 초박절편의 제작법이 개발되면서 ferritin표지 항체의 이용도가 증가하였다.

2. 중금속 표지 항체(heavy metal labeled antibody)

Pope와 Finch(1961)는 수은을 표지물로 이용했고, Sternberger등(1963)은 우라늄을 직접 항체에 표지하는 것과 osmium을 표지물로 이용하여 면역전자현미경에 응용하였지만 명확한 항원의 국제를 증명하는 전자현미경상을 얻지는 못하였다.

표지물로 사용된 대표적인 중금속으로서는 alkaline bismuss나 ferrocene carboxyaldehyde 등이 있었으나, 현재까지 충분한 평가가 내려지지 못하고 있다.

3. 효소표지 항체 (enzyme labeled antibody)

Ferritin표지 항체나 중금속 표지 항체보다 될 수 있으면 크기가 작고, 세포나 조직에는 존재하지 않으며, 전자현미경에서는 콘트라스트가 높은 표지물질의 검색이 많은 연구소에서 이루어 졌다.

면역전자현미경법에서 가장 빈번하게 사용되는 효소 항체법은 특이항체에 서양 고추냉이로부터 분리한 효소인 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP)를 표지하여 이 효소의 활성부위를 효소조직화학적으로 염색해내는 방법이다. 전자현미경의 관찰은 HRP의 반응 산물에 osmication을 실시하여 전자밀도를 높게 하여 관찰하거나 물에 불용성인 3'-3' diamynobenzidine 4HCl(DAB)을 이용하여 관찰한다.

1) 직접법

항원에 대응하는 항체에 직접표지물질 즉, 효소를 표지하는 방법이다.

2) 간접법

제 1항체에는 표지하지 않고 제 1항체에 대한 제 2항체를 표지하는 방법으로 ABC법, PAP법, 효소표지 protein A 법 등이 있다.

Methods

in Immunogold Labelling

of Ultrathin Cryosections

(J.W.Slot)

Colloidal gold는 전해질이 존재하는 상태에서는 불안정하다. 전해질이 증가되면 색이 파랗게 되고 마침내 gold가 침전한다. Protein이 충분한 농도에서 추가될 때 전해질의 존재하에서 안정되게 하며 gold particle에 흡착된다. 10ml의 gold sol.을 안정하게 할수 있는 최소한의 양은 기본적으로 단백질의 (gold number)라 부른다. Gold number 혹은 안정화 농도는 각각의 단백질마다 다르다.

1. Storage of protein - gold complexes

Immunogold probe는 gold particle로부터 단백질이 분리되어 몇주안에 활성이 떨어진다.그래서 저장하는데 주의를 기울여야 한다.

1) Probes를 20% glycerol(in PBS)를 첨가하여 -70도에서 동결 저장하거나(Slot & Gueze, 1985), 45% glycerol을 첨가하여 -20도에 저장할수 있다.(Slot & Gueze,1981)

2) Protein - gold complexes를 0.02% sodium azide를 첨가한 상태에서 반응성이나 손실 없이 냉장고에서 6개월간 저장할수 있다.

2. Fixation

고정액은 보통 paraformaldehyde나 glutaraldehyde, 또는 두가지를 섞어서 사용한다(in 0.1M sodium phosphate). 만약 면역반응이 glutaraldehyde에 민감하다면 2-4%의 formaldehyde 만을 1시간 정도 사용한다. 조직은 formaldehyde에 밤새워(overnight) 놓거나 일주일 이상 놓아둘수 있으나, 이것은 cryosection에서 미세구조를 보존하는데 좋은 반면 점차로 면역반응은 소실된다.

Soluble compounds의 연구시(예; cytosol or secretory proteins), section에서 protein 이 제거되는 것을 예방하기 위해 강한 glutaraldehyde (2%) 고정을 한다. 한편 membrane 이나 cyto-skeleton에 존재하는 물질의 면역염색은 이를 둘러싸는 가용성 단백질의 제거에 의해 종종 향상되어 그 결과 면역반응에 더욱 더 잘 노출된다. 그래서 membrane proteins 연구시 formaldehyde 고정이 더 많이 사용된다. 가용성 단백(soluble proteins)의 재분배를 예방하기 위해서는 고정시간이 빠른 것이 중요하다. 그래서 관류고정(perfusion fix)이 조직을 사용한 연구에서는 더 바람직하다. Formaldehyde와 같이 적은 분자량을 가진 aldehyde류는

고정에 삼투력을 상당히 증가시킨다. 그런 고장액은 골지체와 같은 구조에 영향받기 쉬운 세포에 손상의 원인이 될 수 있다.

Types of Resin

Cross linking

Structure/Stability

Antigenicity

Epoxy

- Araldite

- Epon

High

High

Hydrophobic

Hydrophobic

+++

+++

+

+

Acrylic

- LR White

- Lowicryl

Low

Low

Hydrophilic

Hydrophilic

+

+

+++

+++

Types of Fixtures

Structure

Antigen

Suitability

Additive (cross linking)

- Formaldehyde

- Glutaraldehyde

++

+++

++

+

Tissue

Tissue

Coagulative (precipitating)

- Aceton

- Methanol

+

+

+

+

Cells

Cells

Mixed

- Formal acetone

- Picric acid

++

++

+

+

Cells

Tissues

3. Storage of tissue

고정된 조직의 저장은 a)buffer나 b)formaldehyde액/buffer에 넣거나 (glutaraldehyde를 사용하지 않을 경우) c)sucrose를 주입하여 liquid nitrogen에 넣어 ultra-cryotome의 specimen holder에 봉입한다. 이러한 저장 방법은 몇 주나 몇 달까지 저장이 가능하다. 그러나 post-embedding법과 비교하여 이 방법은 ultra-cryotomy의 단점인 상당 기간 동안 변화되지 않는 상태로 조직을 유지하기에는 부족하다.

4. Gelatin embedding

고정된 조직절편을 10% gelatin/ PB/ 37°C에 침윤시킨다. Gelatin은 4°C에서 0.5mm정도의 얇은 두께로 응고시키고, 30분동안 재고정한다(Geuze and Slot, 1980). 조직절편을 알맞은 모양의 블럭으로 자른다. Bacteria나 배양세포의 현탁액등은 1차 고정한 후 10% gelatin에 넣어 과립화 한다. 그 과립은 0.5mm정도의 얇은 두께로 압착하고 나서, 위에서 언급한 조직과 같이 고정한다. Gelatin embedding은 많은 경우 생략할수 있지만 다음과 같은 장점이 있다.

1) Section시 세포구조는 sucrose방울에서 표면장력에 더 잘 견딘다.

2) 조직 블럭을 원하는 모양으로 만들 수 있다.

3) 세포 현탁액에서 세포는 고정된 상태로 있는데, 이것은 특히 serial section을 원할 경우 장점이 있다.

5. Section

5.1 Freezing

조직 블럭을 최소한 30분동안 2.3M/PB에 침윤시킨다. 그리고 ultra-cryotome의 specimen holder에 블럭을 올려놓고 액체 질소에 빠르게 동결 고정한다. 동결된 조직을 신속하게 -90°C ~ -110°C로 냉각된 ultra-microtome의 cryochamber에 이동시킨다. Tokuyasu는 최근 매우 적게 고정되었거나 많이 수화(hydrated)된 조직을 위해 주입 물질로서 sucrose와 혼합된 polyvinyl pyrrolidone(PVP)을 소개했다. 이것은 block에 가소성을 주어 매우 얇게 하거나 section을 잘 퍼지게 cutting할수 있게 한다.

- Tokuyasu의 방법 -

(100mℓ의 PVP / sucrose 혼합액)

1)PVP 20g

2)1.1M Na₂CO₃4mℓ

3)2M sucrose/PB 80mℓ

를 혼합 용기에 넣는다. 그 용기는 밀봉하여 실온에서 거품이 없어져 깨끗한 액체만 남을 때까지 방치한다. 이러한 방법으로 만들어진 액체는 중성 pH에 가까운데 pH는 1N NaOH로 조정한다. Specimen에 이 액이 주입되는 시간은 보통 2시간이다. 이 혼합액에 주입된 specimen block은 액체질소에 동결하여 -110°C로 자른다.

만약 다른 농도의 PVP는 다음 방법은 다음과 같다.

1) xg : PVP (M.W. 10.000)

2) $(0.2) x (xm\ell)$: 1.1M Na_2CO_3

3) $(100) - (xm\ell)$: 2M sucrose/PB

* x 는 동일한 숫자이며 1, 2, 3번을 혼합하여 사용한다.

고분자량의 PVP를 사용할때는 다음과 같다.

예) 10%의 분자량 40.000 혹은 5% 의 분자량 300.000의 PVP일 경우 :

위의 방법에 따른 carbonate의 양을 각각 $(0.05) x (xm\ell)$, $(0.006) x (xm\ell)$ 로 감소시킨다.

만약, 최종 sucrose 농도가 1.6M 이하라면, 액체 프레온12 혹은 22(liquid freon 12 or 22)와 같은 동결법에서 동결손상(damage)을 예방하여야 한다.

5.2 Knives

Section은 건조유리칼(dry glass knife)을 사용한다. 최근 Griffiths는 유리칼에 텅스텐(tungsten)을 분무하여 section에 괄목할 만한 개선을 가져왔다. 그러나 텅스텐 층은 매우 얇은 반면 section이 유리표면 위로 부드럽게 이동하지는 않는다.

5.3 Picking up

Cryo-chamber안에서 section을 조작할 기구는 15cm정도 나무막대의 끝에 속눈섭과 wireloop를 붙여 사용한다. 좋은 wireloop는 두께 0.2mm, 직경 ~2mm의 stainless steel wire를 사용한다. 속눈섭을 사용하여 section이나 ribbon을 칼끝에서 밑으로 쓸어내려 퍼지게 한 뒤 2.3M sucrose/PB액을 묻힌 loop로 재빨리 채취하여 유리 slide나 grid에 옮긴다.

처음 ~0.5 μ m로 자른 section을 유리 slide에 놓고 위상차 현미경으로 관찰한 후 적당한 수준의 절편이 만들어졌을 때 50 - 100nm의 ultrathin section을 한다. Sucrose 액을 carbon코팅한 formvar grid에 section을 아래로 향하도록 올려놓아, sucrose층의 section이 grid와 밀착하도록 한다.

5.4 Storage of grids

Grid를 2% gelatin/PB/on ice 접시에 밑으로 향하도록 올려놓아 sucrose가 퍼지도록 한다.

이곳에서 grid는 면역 염색하기 전 몇 시간정도 보존할수 있다. 2% gelatin/PB는 실온에서 유동화하며, 축축한 필터페이퍼를 깐 접시(Ø9cm)안에 작은 petri dish(Ø 3cm)를 넣고, 여기에 2-3ml씩 분주하여 냉장고에 보관한다.

6. Immuno-staining

Section이 붙은 grid는 다음의 과정부터 methyl cellulose 단계까지 여러 solution을 거치면서 물방울(drop)에 부유시켜놔야 한다. 물방울은 깨끗하고 평평한 parafilm위에 분주한다. 다음의 모든 단계에 background 염색을 방지하기 위해 1% BSA를 쓰며, 기타 protein solution으로 gelatin이나 10% fetal calf serum을 사용할수 있다. 축축한 상태로 보관된 gelatin을 유동화시킨 후 10분동안 실온에 놓아둔다. 유동화된 gelatin에 grid를 incubation 시키면 background 염색을 예방할수 있다. 그런 후 grid를 다음 단계로 옮긴다.

< PBS 제작 >

8g- NaCl / 0.2g- KCl / 1.44g- NaHPO₄2H₂O / 0.23g- NaH₂PO₄H₂O ☞ total 1 l

Glycine은 free aldehyde group을 억제시키는 기능이 있는데, 0.1% sodium borohydride/PB (~10 min)도 역시 사용 가능하다. 이것들은 또한 aldehyde group을 비활성화 시키며, 추가로 borohydride는 glutaraldehyde고정에 의해 손실된 면역 반응의 일부를 회복시킨다는 보고가 있다.(de Vries, 1985 ; Eldred et al. , 1983)

Grid

↙

← Section

← Drop

Parafilm

※Parafilm상의 drop에서 grid의 염색

b) Specific antibody in PBS/1%BSA

5µl정도의 적은 방울을 분주하여 실온에서 incubation시킨다 ☞ (~30min)

c) Washing with PBS/0.1% BSA ☞ 4x1min

d) Pretein A gold (PAG) 또는 IgG - gold을 실온에서 대략 30분정도 incubation시킨다.

Gold marker는 PBS/0.1% BSA로 사용직전 dilution시킨다. 더 작은 입자는 더 dilution시킬 수 있다. Probe의 농도는 520nm에서의 optical density로 표시하는데 보통 4nm의 marker는 OD 520에서 대략 0.05이고 6nm는 0.1, 9nm는 0.15정도다.

e) Wash with PBS 4x5min

만약 secondary labelling을 할 경우에는 1%의 BSA를 사용한다.

※ Particle Size

Gold particle (nm)

1

5

10

15

20

30

Magnification(screen), ×1000

400

100

40

30

20

10

Particle size (screen), (mm)

0.4

0.5

0.4

0.45

0.4

0.3

Primary antibody

Protein A : gold

Protein G : gold

Rabbit IgG

+++

+++

Mouse IgG

IgM

IgA

++

+/-

+/-

++

+/-

+/-

Rat IgG

+/-

+

Human IgG1

IgG2

IgG3

IgG4

IgA

IgM

+++

+++

+/-

+++

+

+

+++

+++

+++

+++

-

-

Guinea pig IgG

++

++

Goat IgG

+/-

+++

Bovine IgG

++

++

Sheep IgG

+/-

+++

Chicken IgG

+/-

+/-

6.2 Double labeling

PAG를 사용하여 double labeling을 할 경우 ;

조직에서 모든 protein A 접착부분이 덮이도록 하기위해 single labeling의 6.1-d단계의 몇 분동안 free protein A (10µg/ml)를 추가한다. 그 후 washing(6.1-e)을 하고 다른 specific antibody나 PAG probe를 6.1-b부터 6.1-e까지 반복한다.

6.3 PAG or IgG-gold

a) IgG-gold는 label시 보통 더 높은 산출량을 나타내는데, 한 모델시스템에서 PAG labeling의 ~250%정도의 labelling농도가 측정되었다. 그 증가는 signal 증폭의 큰 증가(~100%)보다는 IgG-gold가 더 많은 primary IgG를 인지하기 때문에 증가(~30%)된다. 즉 하나의 PAG marker가 IgG분자와 붙을 때, 더 많은 IgG-gold가 primary IgG에 붙을 수 있다는 것이다. 이것이 PAG marker가 보통 single 로서 분포하는 반면 IgG-gold labeling은 무리지어 나타남을 볼수 있다.

b) PAG는 IgG보다 antigen의 위치를 더 정확하게 표시하는데 이것은 고분해능 연구시 중요하다.

c) IgG-gold가 아닌 protein A gold는 간단한 double labeling이 가능하다.

d) 위에서 언급한바와 같은 이유로 보통 PAG를 더 많이 사용하는데, 만약 강한 labeling을 원할 경우 6.1-c 후에 secondary IgG에 민감한 protein A를 가지고 incubation단계를 추가함으로써 6.1단계를 연장한다. 예를 들어 swine anti rabbit serum(Nordic, Tilburg, the Netherlands)를 1:2.000으로 희석하여 30분 incubation시켰을 때 잘 반응한다. 6.1-c에서 신속히 수세한후 6.1-d에서와 같이 PAG를 incubation할 수 있다. 이 IgG bridge PAG법은 대략 보통의 PAG단계의 600%정도의 매우 강한 labeling을 할수 있다. 150%의 증가는 더 많은 primary IgG가 label되었기 때문이고, signal 증폭이 다른 150%의 증가를 가져왔다.

7. Tokuyasu의 uranyl 염색과 methy cellulose 봉입

7.1 Griffiths의 변법

Membrane구조의 가장 좋은 보존과 묘사는 다음에 설명할 Griffiths et al.(1984)에 의해 설명된 Tokuyasu변법을 쓰는 것이다.

a) 6.1-e후에 grid를 D.W 로 수세한다. ☞ 4x1min

b) Uranyl acetate oxalate (pH7.0-7.5)를 처리한다. ☞ 5min

< 제작 >

0.3M oxalic acid 와 4% 수용성 uranyl acetate를 동량으로 섞는다.

pH : 5%NH₄OH로 약 pH7.5가 되도록 한다.

중금속이 pH전극을 방해하므로 pH paper을 사용해야 한다. 약간의 contrast를 주는 이 과정은 수용성 uranyl acetate의 낮은 pH에 대하여 membrane구조를 안정화시킨다고 생각되어진다(Tokuyasu,1980).

c) 수세 : D.W로 30초동안 3번 수세한다.

d) ① 25centipose(점도의 단위)의 methyl cellulose 2%액을 만든다.

(상품:methocel-Fluka A.G., Buchs, Switzerland)

② 95°C로 미리 가열한 물에 powder를 넣는다.

③ 몇 분동안 95°C에서 magnetic stirrer로 섞은 후 얼음위에 액체를 올려놓는다.

④ 0-4°C에서 최소한 4-8시간 동안 섞는다.

⑤ 4°C에서 3-4일간 방치한다.

⑥ 4°C에서 90분 동안 고속(예; 60,000rpm / Beckman 60Ti or 70Ti)으로 centrifuse한다.

⑦ 멍친 알갱이가 나타나지 않도록 최소 3-4주동안 냉장고에 저장한다.

⑧ 실험을 위해 적은 양을 표층으로부터 조심스럽게 pipetting한다.

⑨ 최종 농도가 0.1-0.4%의 uranyl acetate가 되도록 2-4% 수용성 uranyl acetate액을 가지고 methyl cellulose액을 혼합한다.

(보통, 2% methocel 0.9ml와 3% uranyl acetate 0.1ml를 섞는다.)

⑩ 몇 초동안 똑같이 혼합한 다른 두 drop의 표면에 처음 접촉시킨 후 10분동안 얼음위에서 위의 액에 grid를 놓는다.

e) 직경 3-3.5mm, 두께 0.3-0.5mm의 stainless steel loop를 이용하여 grid를 꺼낸다.

3.5mm의 전기드릴의 금속막대부분을 이용하여 loop를 만들면 편하다.

f) 필터페이퍼의 표면에 접촉하여 액체를 모두 제거한 후 loop위에서 grid를 건조시킨다.

Methyl cellulose의 최종 두께는 contrast와 미세한 구조의 보존을 고려하여 선택한다. 이 두

깨는 옮겨진 액의 양에 의해 경험상으로 결정되며, 마른 후의 film위의 색의 간섭에 의해 평가된다. Film이 두꺼워 짐에 따라 미세 구조의 보존은 contrast의 손실을 회복시킨다. 실험을 하면서 서로 다른 양을 사용하여 EM상에서의 차이점을 알아야 한다. 예를들어 formvar film의 은색(silver) 그림자를 변화시키지 않을 정도의 매우 얇은 film은 매우 높은 contrast를 주지만 공기건조의 artifact를 준다. 안정적인 구조를 위해서는 이방법도 택하여 진다.

아래와 같이 위에서 언급한 과정을 단순화 시켜도 중요한 효과는 없음을 발견했다.

g) 7.1-b와 c를 생략한다.

h) 적당한 농도(0.1-0.4%)의 uranyl acetate를 4-8시간 저온(7.1-d) methyl cellulose stock sol.에 넣는다. (보통 0.3% UAc 농도를 사용한다.)

이 uranyl-methyl cellulose액을 24시간 4°C에 방치한 후 7.1-d에서와 같이 centrifuse하고 몇주동안 보관한다.

7.2 Tokuyasu의 positive contrasting법

통상 Tokuyasu의 실험실에서 사용하는 contrasting법은 다음과 같다.

마지막 수세(7.1-c)를 한 후 grid를 다음의 액위에 올려놓는다.

①2% polyethylene glycol 1540(carbowax)

②0.1% methyl cellulose (1500 centipose)

③0.001-0.02% 수용성 uranyl acetate

①+②+③액을 10분동안 처치한다.

그 후 loop로 들어올려 위에서 기술한 대로 건조시킨다.

이 방법은 다른 방법보다 더 적절한 contrast를 주며, ferritin이나 impositil, 3nm gold particle의 관찰도 같이 할수 있다.

7.3 Section염색이나 embedment의 최근 Tokuyasu변법은 methyl cellulose(MC) 대신에 polyvinylalcohol을 사용한다. MC는 고분자 화합물이라 section안으로 침투하지 않는다. 그래서 건조하는 중에 film이 section위에 형성되어 structure를 지지한다. PVA는 너무 낮은 분자량(10.000)을 가지고 있어, 건조하는 중에 section안에 film이 형성된다. PVA는 MC보다

덜 점착성을 가지고 있어 충분한 지지를 위한 film을 만드는 것이 필요하다. 2% PVA를 사용할 경우 뒤에 그것이 과잉으로 있을 때, 대부분의 PVA가 없어지므로서 7.1-f와 같이 옮겨진다. PVA의 농도는 3-4%까지 증가될 수 있다. Embedding된 section에서 uranyl acetate는 contrast를 얻기 위해 사용하는 PVA액층의 두께 차이의 때문에 2% PVA를 사용하는 것 보다 3-4%의 PVA와 혼합하는 것이 좋다. 추가로 PVA는 MC보다 lead염색과 같이 할 수 있다는 장점이 있다.

PVA를 사용한 염색과정은 다음과 같다.

a) 2% uranyl acetate oxalate pH7-7.5, 5분

수세, D.W, 30sec.

2% uranyl acetate, 5분.

수세, D.W, 30sec.

2% PVA(m.w. 10.000) + 0.01~0.3% uranyl acetate

b) a)에서 2% uranyl 단계는 생략할 수 있다.

c) 2% OsO₄

수세, D.W, few min.

2% uranyl acetate

수세, D.W, 30sec.

2% PVA(m.w. 10.000) + 0.003% lead citrate.

적정한 보존과 membrane 구조의 염색은 a)와 b)의 과정으로 달성할 수 있다. 또한 nucleus와 ribosome은 더 깨끗하게 염색되어진다. c)과정은 cytoskeleton element를 보기에 적당하다.

Colloidal gold

immunolabelling techniques

for electron microscopy

(전자현미경의 금콜로이드 면역표지법)

종류

1. Pre-embedding technique
2. Post-embedding technique
3. Non-embedding technique (동결초박절편법)
4. Scanning electron microscope technique
5. Negative stain technique
6. Replica technique
7. Freeze-fracture technique

1. Pre-embedding technique

1) Lightly fix cells with correct aldehyde or use unfixed

2) Incubate cells with

a. 1per cent gelatin in phosphate-buffered (0.01 M, pH 7.2) - 0.15 M NaCl(PBS) for 10min

b. 0.02M glycine in PBS 3min

c. 1 per cent bovine serum albumin in PBS (PBS BSA) for 2min

- d. Antiserum diluted with PBS BSA (1h)
 - e. Wash 4 * 1 min with PBS BSA
 - f. Colloidal gold probe diluted with PBS BSA (1h)
 - g. Repeat e.
 - h. Rinse with PBS (2*1min)
- 3) Fix cells with 1 per cent glutaraldehyde in PBS at roomtemperature for 15 min
 - 4) Rinse briefly in water
 - 5) Posr-fix with 1 per cent aqueous osmium tetroxide for 1h.
 - 6) Tertiary fix with 2 per cent aqueous uranyl acetate for 1 h.
 - 7) Dehydrate in a graded series of ethanol
 - 8) Embed in Araldite or other preferred resin
 - 9) Cut ultrathin sections and stain with uranyl acetate and lead citrate before examination

* If cells are not fixed, start immunolabelling schedule at 2d.

2. Post-embedding technique

- 1) Prepare sections of fixed and either resin-embedded or frozen tissue on plastic and carbon-coated gold grid. Float these, sections downwards, on the following:
- 2) Phosphate-buffered (0.01 M, pH 7.2) saline(0.15M) containing 1 per cent bovine serum albumin, PBS BSA (5min)
- 3) Phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 per cent gelatin (10min)
- 4) PBS containing 0.02 M glycine (3 min)

- 5) Suitable dilution of antibody in PBS BSA (1h)
- 6) Rinse 5 x 1 min in PBS BSA
- 7) Suitable dilution of gold probe in PBS BSA (1h)
- 8) Rinse (1 min) in PBS
- 9) Fix with 1 per cent glutaraldehyde in PBS at room temperature for 3 min
- 10) Rinse (5 x 1 min) in distilled water
- 11) a. Rinse sections
 - Stain with uranyl acetate and lead citrate
- b. Ultrathin frozen sections(Tokuyasu 1984)
 - Float sections on 2 per cent neutral uranyl acetate (10 min) to stabilize membranes.
 - Three rinses on droplets of water (20s each)
 - Float sections on 2 per cent aqueous uranyl acetate (5 min)
 - Wash (3 x 20s) on droplets of 1.5 % methyl cellulose (400 cps); placed on a sheet of dental wax standing on ice
 - Pick up grid on a loop and remove sufficient methyl cellulose with the edge of a filter paper so that when dry a gold-blue interference color remains
 - Remove grid from loop and examine

2 % neutral uranyl acetate is made by mixing equal volumes of aqueous solution of 4 % uranyl acetate and 0.3 M potassium oxalate and adjusting the pH to 7-8 by adding a small volume of 10 % ammonium hydroxide.

A stock solution of methyl cellulose is made by suspending the required weight of powder in water at 60°C and then cooling to 4°C. It is diluted before use, the dilution being found experimentally to yield the correct thickness after drying the embedded sections.

Pre-embedding

Post-embedding

Fixation



Thick sectioning



Immunostaining



Osmication



Flat embedding in epoxy resin



LM examination



Ultrathin sectioning



EM examination

Fixation



(LM examination)



(Osmication)

↓

Hydrophilic or hydrophobic

resin embedding

↓

Ultrathin sectioning

↓

Immunostaining

↓

EM examination

※A comparison of pre-embedding and post-embedding immunocytochemistry.

3. Non-embedding technique (동결초박절편법)

Cryosections on carboncoated formvar copper grids are floated on drops of :

- 1) 2% gelatin in PB (phosphate buffer pH 7.4 0.1M) - 10min
- 2) 0.02 M glycine in PBS - (3x1min)
- 3) 0.1% BSA in PBS(PBS/BSA 0.1%) - 1min
- 4) Specific antibody diluted in PBS/BSA 1.0%. Drops of appr.5 μ l containing 5-20 μ g/ml specific antibody are sufficient to incubate one grid - (\geq 30min)
- 5) Wash on PBS/BSA 0.1% - (\geq 4 x 1min)
- 6) Only if specific antibodies with weak binding capacity for protein A are used, like sheep and goat IgG and some monoclonals, or when an enhancement of the

gold signal is desired . Bridging antibody (rabbit anti goat, sheep or mouse, swine anti rabbit) diluted in PBS/BSA 1.0% - (\geq 30min)

7) Protein A gold, diluted as incubated for each batch in PBS/BSA 1.0%. Drops 10-20 μ l per grid. Gold probe dilutions are made fresh and used immediately. - (\geq 30min)

8) Wash PBS/BSA 0.1% - (1 x 5min)

wash PBS - (4 x 5 min)

9) Stabilize the reaction on 1% glutaraldehyde in PBS - (5min)

10) Wash on PBS - (2 x 5min)

11) In case of double labelling (3,4)repeat steps 3-9 with different antibody, protein A gold combination after a 5 x 2 min rinse with PBS/glycine. Be careful when step 6 is included, since the two reactions may interact.

12) Distilled water (fresh, not from plastic bench-bottles)- (5 x 2 min)

13) Ice cold 1.8% methyl cellulose (25 ctp)/ 0.4% uranyl acetate (MC-UA) (5,6) - (\geq 5min)

14) Loop out the grids and reduce the MC-UA to an even thin film, and let it dry.

Never let the grid become wet on the back surface or dry out during the incubation procedure.

Resin embedded sections are incubated in the same way, except that:

- BSA may be replaced by 5-10% fetal calf serum (FCS), or a 10 min incubation on PBS/FCS prior to the procedure may be added.
- Antibody and protein A gold incubation periods are prolonged to \geq 60min.
- Washing in distilled water (step 12) is prolonged to \geq 60min.
- Osmium and/or lead contrasting methods usually replace the MC-UA embedding steps 13 and 14.

4. Scanning electron microscope technique

(after Hodges et al. 1984)

- 1) Select tissue according to the aims of the study and carry out pre-fixation in weak aldehyde
- 2) Wash specimens(3 x 5min) with phosphate-buffered(0.01 M, pH 7.2) saline(0.15M) containing 1 % bovine serum albumin(PBS/BSA)
- 3) Incubate tissue with PBS containing 1% gelatin (10min)
- 4) Incubate tissue with PBS containing 0.02M glycine (3min)
- 5) incubate tissue with primary antibody diluted with PBS/BSA(1h)
- 6) Wash specimens (3 x 5min) with PBS/BSA
- 7) Incubate with gold probe diluted in PBS/BSA (1h)
- 8) Wash specimens (3 x 5min) with PBS/BSA
- 9) Fix specimens in 2.5% glutaraldehyde, buffered with 0.05M sodium cacodylate pH 7.2
- 10) Post-fix in 1% aqueous osmium tetroxide (1-2h) or process through the thisemicarbazide-osmium tetroxide schedule (Murphy 1980)
- 11) Dehydrate in a graded series of ethanol, or acetone, critical point dry, deposit a thin conductive coating as necessary then examine using either secondary or backscattered electrons.

5. Negative stain technique

(after Beesley et al. 1984)

- 1) Dry sample on to Butvar/carbon-coated 400mesh gold grid

2) Float on droplet of antiserum diluted with PB(0.01M, pH 7.2) saline(0.15M) containing 1% BSA, PBS BSA(15min)

3) Wash (4 x 1 min) by floating on droplets of PBS BSA

4) Float on gold probe diluted with PBS BSA (15min)

5) Wash by floating on droplets of water (4 x 1 min)

6) Negative stain, e.g. ammonium molybdate 1%, pH 6.8

6. Replica technique

(after Mannweiler et al. 1982)

1) Cells cultured on coverslips are lightly fixed with aldehyde

2) Incubate(1h) with antibody diluted with PB(0.01M, pH 7.2) saline (0.15M) containing 1% BSA, (PBS BSA)

3) Wash (4 x 1 min) by floating on droplets of PBS BSA

4) Incubate (1h) with gold probe diluted with PBS BSA

5) Wash (4 x 5min) with PBS BSA

6) Wash with a suitable EM buffer such as 0.05M sodium cacodylate pH 7.2 then post-fix with 2% aqueous osmium tetroxide

7) Dehydrate with ethenol

8) Critical point dry

9) Replicate with carbon and platinum before examination

7. Freeze-fracture technique

Critical point drying fracture-label

(after Pinto da Silva et al. 1981,1986)

- 1) Fix cells with 1% glutaraldehyde in phosphate-buffered isotonic saline, pH 7.4, 30min at 4°C.
- 2) Embed (if a cell suspension) in 15 or 30% BSA at 25°C and gel with 1% glutaraldehyde for 30 min at 25°C
- 3) Slice gel into 1 x 2 x 2 mm pieces and impregnate gradually with 30 % glycerol (1h)
- 4) Freeze in Freon 22 cooled by liquid N₂
- 5) Transfer gels or tissues to a petri dish filled with liquid N₂ placed on top of liquid N₂ /solid carbon dioxide slush
- 6) Fracture specimen with liquid N₂-cooled scalpel
- 7) Remove glass container to room temperature and allow nitrogen to reduce to 1/10 original.
- 8) Add 2 to 3 ml of glycerol-glutaraldehyde in buffer in liquid form.
- 9) Immerse glass container briefly in water bath at 30°C to thaw glycerol.
- 10) Transfer to an ice bucket for 15min.
- 11) Deglycerinate and quench aldehyde groups by dropwise addition of 310 mOsmol sodium phosphate buffer pH 7.5 containing 1mM glycyl-glycine.
- 12) Wash twice with PBS.
- 13) Incubate fractured tissue or gels with 250µg ml⁻¹ concanavalin A in PBS containing 0.5M CaCl₂ for 30 min at 25°C.
- 14) Wash in PBS.
- 15) Incubate overnight at 4°C with colloidal gold complexed with horseradish peroxidase.
- 16) Wash in PBS

- 17) Post-fix in buffered 1% osmium tetroxide, 2h at 4°C.
- 18) Dehydrate in ethanol and critical point dry with ethanol/ carbon dioxide.
- 19) Attach gels, fracture side uppermost with double-sided sticky tape to specimen carrier and shadow with platinum and carbon and reinforce replica with carbon film.
- 20) Digest tissue in sodium hypochlorite.
- 21) Wash replicas with D.W, mount on Formvar-coated grids and view.

Thin-section fracture-label technique for the detection of concanavalin A binding sites(after Peter da Silva et al. 1986)

- 1) Fix cells with 1% glutaraldehyde in phosphate-buffered isotonic saline, pH 7.4, 30min at 4°C.
- 2) Embed (if a cell suspension)in 15 or 30% BSA at 25°C and gel with 1% glutaraldehyde for 30 min at 25°C
- 3) Slice gel into 1 x 2 x 2 mm pieces and impregnate gradually with 30 % glycerol (1h)
- 4) Freeze in Freon 22 cooled by liquid N₂
- 5) Place the gels in a glass container (e.g. the base of a tissue homogenizer) filled with liquid nitrogen and cooled in a slush of liquid nitrogen and solid carbon dioxide.
- 6) Add drops of a 30% glycerol, 1% glutaraldehyde solution in 310 mOsmol phosphate buffer pH 7.5, in an amount approximately equal to that of the gels or tissue. Allow this and the gels to sediment.
- 7) Fracture gels with a glass pestle at -190°C until pulverized into fine fragments.
- 8) Remove glass container to room temperature and allow nitrogen to reduce to 1/10 original.

- 9) Add 2 to 3 ml of glycerol-glutaraldehyde in buffer in liquid form.
- 10) Immerse glass container briefly in water bath at 30°C to thaw glycerol.
- 11) Transfer to an ice bucket for 15min.
- 12) Deglycerinate and quench aldehyde groups by dropwise addition of 310 mOsmol sodium phosphate buffer pH 7.5 containing 1mM glycyl-glycine.
- 13) Wash twice with PBS.
- 14) Incubate fractured tissue or gels with 250µg ml⁻¹ concanavalin A in PBS containing 0.5M CaCl₂ for 30 min at 25°C.
- 15) Wash in PBS.
- 16) Incubate overnight at 4°C with colloidal gold complexed with horseradish peroxidase.
- 17) Wash in PBS
- 18) Post-fix in buffered 1% osmium tetroxide, 2h at 4°C.
- 19) Tertiary fix with 0.5mg ml⁻¹ uranyl acetate in veronal acetate pH 6.0, 90min at room temperature.
- 20) Dehydrate in a graded series of ethanol or acetone and embed in resin of choice.
- 21) Cut thick sections to determine required area for EM observation
- 22) Cut ultrathin sections, stain with uranyl acetate and lead citrate, and examine.