

# 초박절편용 Diamond knife에 관하여

이인식 (가톨릭대학교 의과대학)

1960년대 후반부터 실용화가 되기 시작한 전자현미경(보통 투과전자현미경을 칭함)은 현재 의학·생물 분야 뿐만 아니라 금속 재료 공학분야에 이르기 까지 폭 넓게 이용되고 있는 첨단 전자 장비이다. 전자현미경은 물질의 형태와 분석 미세구조를 밝혀내는데도 없어서는 안될 장비이다. 의학·생물학 형태와 미세구조 관찰에 있어서 전자현미경을 이용하려면 관찰하려는 표본을 고정·탈수·포매라는 과정을 거쳐 얇은 두께의 절편을 제작하지 않으면 안된다. 왜냐하면 절편이 얇으면 얇을수록 전자beam의 투과가 용이하여 원하는 구조물을 잘 볼수 있기 때문이다.

보통 광학현미경의 절편조직 두께는 6 $\mu$ m정도이나 전자현미경의 조직 두께는 30nm~80nm를 원하기 때문에 이 초박절편의 제작은 전자현미경 표본제작 기술의 중요한 부분을 차지하고 있고 절편제작에는 knife가 매우 중요하므로 절편제작 knife에 관하여 서술하고자 한다.

## I. Knife의 종류

### 1) 유리칼

60년대 말에서 70년대부터 전자현미경이 도입되기 시작한 이래 국내 전자현미경을 관찰하기 위한 표본제작 즉, 초박절편을 만드는데 사용되어온 칼이다. 지금까지 유리칼은 초보자나 기술경험이 많은 기존 경험자나 꼭 필요한 칼이고 절편(초박)제작 예비작업에 꼭 사용되는 칼로써 판유리와 LKB사에서 제작되어 나오는 유리막대형 유리가 있으나 가격이 비싼 것이 흠이다. 칼의 각도는 4°이고 유리칼 제작기로 유리칼을 만들어 사용한다. 보통 5~6매의 초박절편을 얻을 수 있고 칼날의 마모가 심하고 칼을 자주 교환해야 하는 단점이 있다.

### 2) Diamond knife

Diamond knife는 수년전만해도 국내에서는 희귀하고 귀중한 knife로 생각되어져 왔고 사용자도 별로 없었다고 생각된다. 물론 일본이나 미국, 유럽쪽에서는 diamond knife가 보편화 되어 양질의 절편으로 선명한 사진을 찍어 책으로도 출판하고 있었지만 국내에서는 수입유리로 만든 유리칼이나 국산유리칼로도 웬만한 초박절편을 얻을 수 있었으나 고배율로써 관찰할 경우 diamond knife에 미치지 못하는 점이 많았다. 즉, 기저막이나 미토콘드리아, RER등의 선명도와 간격등의 미세구조가 선명치 못한 점은 유리칼이 지닌 한계점이라고 할 수 있었다. 그러나 diamond knife는 이런 것을 선명히 보여주는 양질의 칼임은 널리 알려진 사실이다.

현재는 각 대학과 병원에서 보편화 되어 사용하고 있다. 이에 연자는 diamond knife를 오래 사용한 경험자의 한사람으로 전에도 대략적인 내용을 발표했으나 차제에 좀더 상세한 내용을 기술해서 실무자들에게 도움이 되었으면 한다.

## II. Diamond knife의 용도와 종류 및 사양

### 1) 용도 및 재료

Diamond knife의 용도는 생물시료의 초박절편제작(면역세포학, 면역조직화학 포함) 및 금속 재료공학의 고분자, 연한물질, 세라믹, 플라스틱, 결정, 유리, 고무 등을 절삭하는데 널리 쓰이고 있다. 동결절편용 diamond가 주로 금속재료용으로 많이 사용되고 있다. diamond knife는 공업용 diamond가 재료이다(인공 diamond).

### 2) 장점

Diamond knife의 장점은

1. 얇은 절편을 얻을 수 있고,
2. 줄어들지 않는 최상의 한가지 모양의 절편을 얻을 수 있으며,
3. 길게 연속적인 절편을 쉽게 얻을 수 있고,
4. 시간이 유리칼절편제작보다 훨씬 절약된다(유리칼의 1/3 정도).
5. 나이프 교환작업이 없고 온도에 변화가 필요없는 점이다.

### 3) 단점

1. Knife의 가격이 고가인 것이 최대 단점이다(knife 가격 1set : 약 350만원~370만원 선).
2. Knife의 날이 흠집이 생기면 흠집난 부위는 재연마 하지 않으면 사용 못함.
3. 고가의 knife 이므로 사용 후 철저한 청소와 공기나 먼지가 끼이지 않도록 철저한 관리가 요망된다.

### 4) 종류와 사양

#### 1. 초박절편용(ultra)

칼 각도 : 35°, 45°, 55°

절편두께 : 30nm: 150nm

칼의 폭 : 1.2mm; 4.0mm

45°용 : 통상 초박절편용 나이프로 추천되며, 현재 제일많이 사용됨.

35°용 : 생물 및 재료계통 시료에 사용되며, 절삭중에 일어나는 수축, 절편이 휘어지는 등의 손상을 감소시킬수 있음.

55°용 : 세라믹, 결정, 유리, 산화물등의 단단한 물질의 절편제작에 사용하기 적합함 .

#### 2. 동결절편용(cryo)

칼 각도 : 35°, 45°

절편두께 : 50nm:1µm

칼의 폭 : 1.2mm;4.0mm

용도 : 생물시료 동결절편(면역세포학, 면역조직화학), 형태학연구 및 타 분야에 사용 됨. 재료 과학에 있어서 동결절편은 중합체 및 다른 연한 재료의 절편을 얻을 수 있는 유일한 기술임.

3. 일반적인 박절편용 diamond knife의 폭은 3mm가 가장 많이 사용되고 있으며 ultramicrotome에 장착하는 각도는 60이다.

### III. Diamond knife의 사용과 세척 및 재연마

#### 1) diamond knife의 사용의 실제

1. 유리칼로 조직주위에 각을 내고 평면을 절삭하여 놓음.
2. knife와 block의 절삭표면을 일치 시킨다. 동시에 각도 60을 확인.
3. 절편제작을 시작하여, boat위에 나열 되어있는 절편을 순서대로 grid에 올린다.
4. grid에 부착된 절편을 건조시킨 뒤 grid box에 집어넣어 보관한다.
5. boat 위에 남아있는 절편조각은 눈썹으로 찍어서 제거한다.

#### 2) Diamond knife의 세척

Diamond knife의 사용후 칼날의 세척은 매우 중요한 과정으로 칼날 주위의 지지분한 부위를 깨끗이 세척하여야 한다. 칼날은 물을 싫어하는 경향이 있으므로 세척에 가장적합한 폴리스치론 봉에다 바르는 수용액을 발라서 칼날에 균일하게 사용하면 칼날이 깨끗이 세척됨.

#### 3) Diamond knife의 재연마

고가의 diamond knife도 장시간 사용하면 칼날이 마모되어 칼자국이 절편에 생기고, 절편이 분리되어 절삭되는 현상이 나타나면 칼날을 재 연마하여야 하는데 재 연마하는 기간은 2 ~ 3개월 정도 걸리며 가격은 신제품의 2~3배가 가격이 든다. 재 연마한 경우 사용기간은 약 1년정도 사용할 수 있으나 시제품과 비교할 때 가격차이가 크지 않으므로 새것을 구입하는 경우도 많다.

#### 4) 구입시 주의할점

Diamond knife의 신형가격은 350 ~ 370만원대의 고가품이므로 구입시에는 칼날의 이상 유무에 특히 주의와 확인이 필요하며 처음 사용할 때 칼날의 흔들림과 칼자국이 가끔 발생하는 불량한 칼도 있으므로 이상이 있을 때는 즉시 공급 회사에 반납하고 양호한 칼로 교체 구입하

는 것이 좋다. 칼날의 수명은 다소 차이가 있을수 있으나 매일 사용하는 경우 1~2년 정도 사용할 수 있으며 한곳을 계속 사용하면 칼날의 마모가 일어나므로 사용하면서도 각별한 주의를 필요로한다.

## Formvar 지지막 제작법

1) 목적: 절편이 전자 beam에 의하여 찢어지는 것을 방지하고 절편을 튼튼히 보강하는데 그 목적이 있으며, 특히 one hole grid 또는 100 mesh 이하의 grid에서는 grid 격자에 절편을 부착시키기 어려우므로 필수적이다.

## 2) 용액제작법

### 1. 준비물

- ① chloroform 원액: 100ml
- ② formvar 분말: 0.3g

### 2. 제작법

- ① 100ml chloroform 용액 + 0.3g formvar분말
- ② formvar 분말이 chloroform 용액에 완전 용해될때까지 기다림.

### 3) 제작의 실제

formvar용액이 준비되면

- 1. slide glass를 깨끗이 세척한 후
- 2. coplin jar와 사각 jar를 준비한다.
- 3. 사각 jar(또는 film을 띄우기 적합한 container)에 증류수를 완전히 채운다.
- 4. coplin jar에 formvar 용액을 부어 넣는다.
- 5. slide를 formvar 용액(coplin jar)에 담근다.
- 6. 용액이 묻지 않은 손잡이 부분을 위로 향하게 하여 filter paper 위에서 잠시(1 ~10 분) 말린 후 slide 주위를 면도날로 #53904;어서 막이 잘 떨어지도록 준비한다.
- 7. 30o 내지 40o 각도로 증류수가 있는 jar 속에 천천히 집어 넣어서 물의 표면위에 막을 띄운다.
- 8. 수면위에 막이 형성되면 형성된 막위에 grid를 원하는 양 만큼(대개 12개 정도) pincette 으 로 사뿐히 올려둔다.
- 9. filter paper나 parafilm을 적당한크기로 잘라서 grid가 올려져있는 지지막위에 붙인후 신속히 걷어 올려서 물기를 제거한 후 37o 내지 45o에서 10분간 말린 후 grid box에 넣어두고 사용한다.
- 10. 막이 제대로 입혀지지 않은 grid도 많이 있을 수 있음.

# 효소조직화학 (Enzyme Histochemistry)

노재요(서울의대)

## I. 효소조직화학의 개념

조직화학 또는 세포화학이라 불리우며 조직이나 세포의 구조를 가능한한 손상을 입히지 않고 각종 물질의 분포나 국재(localization)을 화학적으로 검출하기 위한 방법이다. 따라서 효소조직화학에서 효소활성을 검출하는데 있어서는 다음과 같은 내용들에 세심한 주의가 필요하다.

- 1) 효소반응의 특이성 (substrate에 대한 특이성, 최적 pH, 온도, inhibitor, activator)
- 2) 효소가 본래 존재한 조직의 세포부위(localization)에 정확하게 보존되어 있을것.
- 3) 효소조직 화학반응을 행할때 효소의 실활을 막을것.
- 4) 효소반응에 의해 생긴 산물(reaction product)을 조직세포에 침착시켜 가시화 할 것.
- 5) 반응산물의 확산(diffusion), 다른부위에 흡착(adsorption)되는것을 막을것.
- 6) 조직세포의 구조(structure)보존등이 있다.

효소는 국제적인 분류법에 의해 크게 6군으로 나누어지며 그중 전자현미경에 의해 증명되는 효소는 80종류 이상에 이른다. 여기서는 비교적 흔히 증명되는 효소가운데서 가수분해 효소 몇가지에 대하여 반응원리 및 반응기질액의 조성, 제작법등에 대해 알아보기로 한다.

## II. 지표효소(marker enzyme)검출법에 의한 전현효소 세포화학

효소활성을 전현 세포화학적으로 검출하는 것은 형태학적인 미세구조와 생화학적인 기능과의 관련성을 이해하는데 중요한 수단이지만 동시에 다른 목적에도 응용할 수가 있다.

즉 효소는 전자현미경 수준에서는 특정한 세포내 소기관에 각각 특이적으로 국소에 존재하는 경우가 많기 때문에 이것을 이용하여 이 세포내 소기관의 특이적인 효소를 지표효소(marker enzyme)라 부르고 이것을 검출함으로써 세포내 소기관의 동향 추적을 용이하게 할수있다.

세포내 소기관별로 검출 가능한 효소명을 보면

세포막 : alkaline phosphatase, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

미토콘드리아 : ATPase, alkaline phosphatase

소포체 : Glucose-6-pase, NDPase, TPPase

골지체 : NDPase, TPPase, Alkaline-Pase, Acid-Pase

리소소솜 : Acid-Pase

퍼옥시솜 : Catalase

등이며 전현효소 세포화학적으로 검출된 효소 활성은 그 효소가 가지는 생화학적 기능을 고찰함으로써 그 세포내 소기관의 미세구조가 가지는 의미를 한층 더 이해할 수 있게된다.

### III. 효소 조직화학의 일반원리

생체조직내에서 효소의 존재를 보기 위해서는 적절한 조건하에서 작용시켜 기질이 효소에 의해 가수분해되어서 생성된 반응산물(reaction product)을 국소 위치에 침전시켜 여러가지 방법들에 의해 가시적 상태로 해서 증명하는 방법을 사용한다.

즉 효소활성의 검출원리는 기질(substrate)이 특이 효소에 의해 분해된 결과 생성한 1차 반응 산물을 포착제(capturing agent)와 반응시켜 광현적으로 또는 전현적으로 눈에 보이는 침전을 형성케하여 최종 반응산물로 바꾸어서 효소활성 존재부위를 증명하려고 하는 것이다.

Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>- ATPase (Mayahara et al, 1979 a,b)

Step 1. 2% Paraformaldehyde + 0.5% Glutaraldehyde /

0.1 M pH 7.2 Cacodylate buffer about 60 min

Step 2. 0.01M Cacodylate buffer (pH 7.2, 0.25M Sucrose, 10% DMSO)

30 min-overnight (rinse)

Step 3. Microslicer or Vibratome (tissue cutting) about 30-40µm

Step 4. Incubate in substrate

Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>- ATPase (Mayahara et al, 1979)

\* Substrate

1.0M Glycine-KOH Buffer (pH 9.0) 2.5 ml

10mM Lead Citrate (50mM KOH solution) 4.0 ml

DMSO 2.5 ml

0.1M p-Nitrophenylphosphate (NPP, Mg salt) 1.0 ml

Bromotetramisole 1.87 mg

or Levamisole 6.02 mg

Total 10.0 ml

Final pH 8.8 - 9.0

reactive time 5 - 20 min

(room temp)

Step 5. 0.01M Cacodylate buffer (pH 7.2, 0.25M sucrose, 10% DMSO(-)) 3-5 times

Step 6. 1% Osmic acid / 0.1M pH 7.2 Cacodylate buffer about 30-60 min

Step 7. 0.01M Cacodylate buffer (pH 7.2, 0.25M sucrose, 10% DMSO(-))

----- Processing for conventional Electron Microscopy

ALKALINE PHOSPHATASE (Ogawa-Mayahara)

Step 1. 2% Paraformaldehyde + 1.25% Glutaraldehyde /  
0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer

Step 2. 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer (rinse)

Step 3. Incubate in substrate

\* Substrate

0.2M pH 8.5 Tris HCl buffer 1.4 ml

0.1M Sodium-B-Glycerophosphate 2.0 ml

0.015M Magnesium sulfate 2.6 ml

0.5% Lead citrate (pH 10.0) 4.0 ml

Adjust pH to 9.2 - 9.4 (0.1N NaOH)

Step 4. 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer

Step 5. 1% Osmic acid / 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer

Step 6. 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer

----- Processing for conventional Electron Microscopy

ACID PHOSPHATASE (Barka and Anderson)

Step 1. 2% Paraformaldehyde + 1.25 % Glutaraldehyde /  
0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer

Step 2. 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer (rinse)

Step 3. 0.1M pH 5.0 Tris-maleic buffer (rinse)

Step 4. Incubate in substrate

\* Substrate

0.1M pH 5.0 Tris-maleic buffer 10 ml

D.D.W. 10 ml

1.25% Sodium-B-Glycerophosphate (pH 5.0) 10 ml

2% Lead Nitrate 2 ml

Adjust pH to 5.0 (1N NaOH)

Step 5. 0.1M pH 5.0 Tris-maleic buffer (rinse)

Step 6. 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer (rinse)

Step 7. 1% osmic Acid / 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer

Step 8. 0.1M pH 7.4 Cacodylate buffer

----- Processing for conventional Electron Microscopy

Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) (Wachstein and Meisel)

\* Substrate Final concentration

0.2M Tris-maleic buffer (pH 6.7) 20 ml 0.08 M

D.D.W. 27 ml

Glucose-6-phosphate (dipotassium salt) 25 mg 1.49 mM

2% Lead Nitrate 3 ml 0.12 mM

Sucrose 4 g 0.23 M

---

Total 50 ml

Adjust pH to 6.7

Thiamine Pyrophosphatase (TPPase)(Novikoff and Goldfischer)

\* Substrate Final concentration

Thiamine pyrophosphate (chloride) 24 mg 20 mM

D.D.W. 7 ml

0.2M Tris-maleic buffer (pH 7.2) 10 ml 80 mM

1% Lead Nitrate 3 ml 3.6 mM

0.05M Manganese chloride 5 ml 5 mM

---

Adjust pH to 9.0



# 면역전자현미경법 (Immunoelectronmicroscopic method)

권중균(한양의대)

## I. 면역조직화학의 발달사

면역조직화학(immunohistochemistry)은 Marrack(1934년)가 항체에 어떤 표시를 하여 조직 내 항원과 반응시키면 조직내 항원의 위치를 찾을 수 있다는 이론을 최초로 발표했다.

또, Coons(1941년) 등은 항체에 형광물질을 표시하여 항원과 항체 복합체의 위치를 확인하는 실험에 성공하였다. 표식제로 형광물질 대신 여러 가지 효소(enzyme)를 이용하는 방법이 1960년대 말부터 개발되었고, 세포구성 물질의 분리기술과 항체를 생산할 수 있는 기술이 개발된 1980년대 이후 급속히 면역조직 및 세포화학은 발전하였다.

1990년대에 와서는 신포매제에 의한 방법과 첨단기기의 개발, 동결초박절편법의 진보, Colloidall gold immunolabeling 기술의 존재를 바탕으로 많은 연구와 실험이 이루어 지고 있다.

## II. 면역조직화학의 개념

면역조직화학이란 어떤 항원의 영향으로 형성된 항체(Antibody)는 항체형성을 유도한 특정항원에 특이적으로 결합한다는 면역학적 이론을 세포나 조직을 구성하는 특정한 물질의 증명에 이용된다. 면역(immune)이란 자기자신과 자기자신이 아닌 것을 구분하는 것을 기본으로 하기 때문에 혈액순환을 하는 모든 생물은 개체를 구성하고 있는 물질이 아닌 이질체(foreign body)가 주입되면 이를 구분하고 이질체를 제거하기 위한 반응을 나타낸다. 이런 반응 가운데 하나가 항체의 생성이다.

세포 및 조직 내에 존재하는 항원성 단백질이나 다당체 등의 항원물질을 검출하는 방법으로 항원 항체 반응이 갖는 특이성과 예민성을 이용하여 조직에 응용하는 것으로 대단히 유용한 방법이며 의학, 생물학의 각 분야에 널리 사용되고 있다.

면역 조직 화학적 방법에는 형광항체법, ferritin 항체법, 중금속 표식 항체법, 방사선 동위원소 표식 항체법, 효소항체법 등이 있으며, 면역 전자현미경적 방법에 의한 항원 항체의 특이적 반응을 이용한 미세구조의 관찰에서 이를 위한 표식물질로는 ferritin, peroxidase, colloidal gold등이 있다.

면역 전자현미경의 개발은 ferritin 표식 항체를 사용하였으며 세포 표면 항원의 증명이 주체가 되었으며 효소 표식 항체가 소개된 직후에 조직세포내 항원의 증명에도 이용하였다. 그 이후 Vib ratome은 10-50 $\mu$ m 정도의 절편을 얻을 수 있기 때문에 널리 보급되었다. 현재 이

방법이 대표적인 pre-embedding법으로 광학현미경에 의한 관찰결과와 대조할 수 있기 때문에 많이 이용되고 있다.

즉 면역 전자현미경적 방법은 전자현미경으로 초미세구조를 관찰하는 것 뿐만 아니라 항원항체 반응을 이용하여 조직 세포 내에 존재하는 물질의 위치를 표현하고 관찰하는 방법의 하나이다.

### III. Immunocytochemistry의 구분

- 1) 포매전 방법(Pre-embedding technique)
- 2) 포매후 방법(Post-embedding technique)
- 3) 동결초박절편법(Frozen ultrathin section technique)

### IV. Immunocytochemistry의 비교

미세구조의 전자현미경적 관찰에서 pre-embedding법은 일반 전자현미경적 조직 처리과정처럼 시행하고 중합 전의 조직 절편 상태에서 면역 염색을 시행한 다음 포매중합을 하고 그 다음 초박절편을 만들어 전자현미경 관찰을 한다. 반면에 post-embedding법은 면역 염색과정을 중합이 완료된 plastic block에서 초박절편을 만들어 grid에 얹은 후 면역염색을 실시한다.

Pre-embedding법은 10~50 $\mu$ m정도 두께의 조직 절편을 이용하므로 항체의 침투가 약하다는 단점이 있는 반면 다음과 같은 특징이 있다.

첫째, post-embedding법에서는 항원이 탈수와 포매중합 과정에서 항원성이 소실되거나 위치가 불확실한 결과로 나타날 수 있다. 따라서 pre-embedding법은 항원이 낮은 농도로 존재하거나 특히 항원이 embedding에 따라 민감할 경우에 이용가치가 높다.

둘째, Osmium tetroxide는 membrane contrasting에는 효과적이거나 다른 많은 항원은 이것에 매우 민감하기 때문에 post-embedding법에서는 사용을 피하고 있다. 그러나 pre-embedding법일 경우에는 Osmium tetroxide가 면역 염색이 완전히 끝난 후 사용되고 탈수와 embedding이 이루어지기 때문에 항원성의 소실을 막을 수 있다. 따라서 pre-embedding방법은 대체로 osmium tetroxide가 충분한 membrane고정과 contrasting을 필요로 하는 경우에 효과적으로 이용할 수 있다.

동결초박절편법은 초저온으로 조직을 처리하여 화학고정제로 인한 영향을 줄일 수 있으며 항원보존성이 대체로 우수하며 조직 세포내 artifact를 최대한 줄일 수 있는 방법으로 인식되고 있다. 또 단 시간에 결과를 볼 수 있는 등 몇가지 장점이 있다. 그러나 설비투자 등에 비용이 많이 들고 액체 질소를 항상 공급 받아야 하는 등의 유지관리비도 높다. 특이나 시료 처리과정의 높은 기술습득과 냉동초박절편을 얻기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

## V. 조직세포내 Ag의 존재유무 및 확인 실험(광학현미경의 면역화학적 방법)

### 1) Negative control Test

Primary Ab not Incubation → No reaction : 당연한 결과

### 2) Positive control Test

Primary Ab Incubation → Reaction : 항원존재, 시약의 유효성

## VI. 조직 세포의 적합성 문제점

### 1) 조직세포의 항원 존재 유무확인

1. 세포내 Component Cytoplasm 및 핵에 존재 세포의 Component 기질에 존재 (excollagen 등)

2. 조직의 종류  
질병발생상태

### 2) 조직내 항원의 소실여부 (항원성의 보존)

1 항원성의 강약 정도 : 온도, 시약

2 검체처리 과정 : 고정, 수세, 탈수, 포매등 절편제작과정

### 3) Ab의 적절한 선택 여부

1 물질의 특성파악

2 특이성과 확실성이 높은 항체의 선정

## VII. 조직편 처리과정중의 문제

1) 고정의 문제 - 고정제의 종류, 농도, 고정시간, 온도의 영향

2) 탈수의 문제 - Ethanol 계

3) 포매제와 침투 및 중합

1. 상온침투 : LR white , Epon-812

2. 저온침투 : Lowicryl K4M , Unicryl

### VIII. 면역금 표지법의 재료 및 시약

#### 1) 재료

- A. Nickel grid
- B. Petri dishes
- C. Forceps
- D. Washing bottle
- E. Farafilm
- F. Micropipets
- G. Filter paper
- H. Specimen bottle
- I. Incubator, etc

#### 2) 시약 (Reagents)

- A. Fixative
- B. 3% sucrose
- C. Ethanol
- D. Landon resin white
- E. Immuno gold (goat anti-rabbit)
- F. Cacodylate buffer
- G. TRIS(no Tween & Nacl) buffer
- H. 0.5M NH<sub>4</sub>CL in TRIS buffer
- I. TRIS + Tween + Nacl buffer
- J. Distilled water

### IX. 전자현미경 면역금표지법 처리과정

#### 1) Immunogold technique

1. Fix tissue in 4% paraformaldehyde + 0.5% glutaraldehyde + 0.3% sucrose (in cacodylate buffer : PH 7.4) 2hr in room temperature
2. 3 times × 5min wash in cacodylate buffer
3. 15min - 20% ethanol
4. 15min - 50% ethanol
5. 1hour - 2% uranyl acetate (in 70% ethanol)
6. 3 times × 20min - 75% ethanol
7. 2changes × 1 hour LR white hard grade all step at 4°C

\* Embedded : 00 size gelatin capsule

\* Polymerize 48hour at 43°C

## 2) Immunorun

### 1. Immunogld staining

① Rehydrate with distilled water

② Quenching 30min 0.5M NH<sub>4</sub>Cl in TRIS buffer

③ Wash 4 times × 2min in TRIS (no Tween & NaCl)

2. Blocking : 1% BSA in TRIS buffer (overnight at 4°C)

3. Incubation : Primary Ab in buffer (1% BSA/TRIS + Tween + NaCl)

4. Rinse : TRIS + Tween + NaCl buffer

5. Preincubation : 1% BSA in TRIS buffer

6. Incubation : Colloidal gold (1:50 dilution) in TRIS + Tween + NaCl

1% BSA secondary Ab reaction

\* Colloidal gold의 particle size

① 시료에 따라 선택

② 표지강도 (labelling intensity)와 표지효율 (labelling efficiency)을 고려 함

ex) 표지강도 ↑ large size (15nm)

표지효율 ↑ small size (5nm)

\* 일반적으로 10-20nm를 많이 이용

7. Rinse :

① TRIS + Tween + NaCl

② Distilled water

③ Dry

8. Post staining

① 4% uranyl acetate in distilled water

② Rinse in distilled water

9. TEM Observation