

TEM 시료제작

박창현 (고려대학교 의과대학)

I. 조직 채취 (Sampling)

1. TEM 조직이든 SEM 조직이든 가급적 작게 채취하는 것이 좋다. 특히 TEM 에서는 1x1x1mm 정도로 작게 하는 것이 좋다.
2. 방향성이 요구되는 경우에는 1x1x2mm 정도로 한쪽 방향을 약간 길게 하여야 후에 embedding 과정에서 포매하기가 용이하여진다. (skin, nerve등)
3. 조직을 채취하는데 시간이 오래 걸리거나, 고정이 잘안되는 조직은 perfusion 한후 채취한다.
4. 실험동물을 사용시에는 마취후 살아있는 상태에서 필요 부분을 잘라낸다.
5. 신속히 고정액에 담아야 한다.

II. 고정 (Fixation)

1) 고정의 목적

1. 고정이란 세포의 autolysis를 방지하고 세포성분의 응고 및 경화 시키는 것이다.
2. 세포의 구조가 살아있는 상태에서의 변화를 최소화시켜서 잘 보존시킨다.
3. 탈수 과정및 후에 전자 beam 에 노출 되었을때 조직을 보존하기 위함이다.

2) 고정액 (fixative)의 선택

1. 이상적인 고정액은 조직의 수축 또는 팽창등의 변화를 최소화하며 빨리조직내에 침투하는 고정액이다.
2. 전고정에는 aldehyde 계통은 2% 정도의 paraformaldehyde fixative나 2%정도의 glutaraldehyde fixative가 많이 사용된다.
3. TEM 조직 고정에는 glutar. fixative 단독으로 사용하거나 paraform.과 glutar. 혼합 fixative를 많이 사용한다.
4. SEM 조직 고정시는 glutar. fixative 만을 사용하는 경향이 많다.
5. 후고정에는 중금속인 1% OsO4를 사용하여 조직을 더욱 안정시키고 전자밀도(contrast)를 증가 시킨다.

3) 완충액 (buffer)의 사용

1. 고정액의 pH와 삼투압을 조절하기 위하여 완충액을 사용함. (pH 7.2 - 7.4)
2. 전고정과 후고정 사이에서 이들 고정액들간의 화학적 반응을 방지하기 위하여 고정액에 사용된 같은 buffer 로 세척을 한다.
3. 후고정후에도 과도한 fixative 의 제거 및 고정액과 탈수제 사이의 반응을 방지하기 위하여 세척을 한다.
4. Buffer 에는 phosphate, cacodylate, veronal acetate buffer외 많은 종류가 사용되나 통상 phosphate 나 cacodylate buffer가 많이 사용된다.

4) 고정액의 온도 및 시간

1. Autolysis 나 extraction 을 최소화 하기 위해서 0-4°C 의 저온에서 실시한다.
2. 전고정액에는 2-4시간 고정한다.
3. 후고정액 (OsO4)에는 1-2시간 정도 고정하며 2시간을 절대로 넘기지 않는다.
4. Microtubule과 같은 Cytoskeleton이 주된 관심 분야인 경우에는 오히려 extraction을 촉진하여 관찰이 용이하게 되도록 하고자 실온에서 실시하기도 한다.

5) 고정액 사용시 주의 사항

1. OsO4는 1gm 으로 시판되는데 용해가 잘 안되므로 최소한 사용하기 1일전 증류수에 2% 용액으로 만들어 갈색병에 담아서 냉장고에 보관한다.
2. 고정액은 눈, 코의 점막, 기도 등에 손상을 주므로 작업시에는 반드시 hood에서 다룬다.

III. 탈수 (Dehydration)

1) 탈수의 목적

1. TEM 관찰을 위해서는 초박절편을 제작하여야 하므로 조직을 포매 하여야 한다.
2. 이러한 포매제는 일반적으로 물과 잘 혼합되지 않으므로 물과 포매제에 잘 섞이는 용제로써 조직내의 free water를 제거 하여야 한다.
3. 또한 조직내의 수분은 높은 표면 장력으로써 구조적 역할을 하고 있으므로 물보다 표면장력이 낮은 유기 용매로 서서히 대체시킨다 즉 50% 부터 100% 까지 점차로 실시한다.

2) 탈수방법 및 시간

1. 조직의 성질과 크기등에 따라서 탈수 시간이 달라지나 가능한 짧은 시간내에 실시한다.
2. 탈수시간이 너무 길면 조직으로 부터 물질의 유출 (extration)의 우려와 조직의 수축등이 일어 날 수 있다.
3. 탈수시간이 너무 짧으면 불완전한 탈수로 인하여 후에 포매과정도 불완전하여 절편제작 (sectioning)시 많은 어려움이 발생하게 된다.

3) 탈수용매의 종류

1. Acetone: 포매제와 잘 섞이므로 탈수후 치환제가 필요없으나, 흡습성이 강하여 불완전한 탈수가 우려된다. 그러나 ethanol보다 값이 싸므로 이용하는 경우도 많다.
2. Ethanol: 가장 일반적으로 많이 사용되는 우수한 탈수제이나, 지질 유출능력이 비교적 강하고 epoxyresin과 같은 포매제에 잘 섞이지 않으므로 ethanol 탈수후 치환제를 필요로 한다.
3. Propylene oxide: 주로 치환제로 사용되는 탈수제이다.

4) 탈수의 실제

- 50% Ethanol 5-20 min 1-2회
- 60% " " "
- 70% " " "

90% " " "

100% " " 3회

Propylene oxide " 2회

IV. 포매 (Embedding)

1) 포매의 목적 및 과정

1. 고정 및 탈수가 끝난 조직에 포매제를 완전하고 균일하게 침투시켜야 후에 초박절편(thin section)제작이 용이하게 된다.

2. 조직내의 탈수 용매를 포매제와 대체시켜주고 (infiltration), 조직내의 모든 틈새를 포매제로 채워 (embedding) 넣는 과정이다.

2) 침투 (infiltration)

1. 침투는 탈수후 포매제로 점진적 대체시키는 방법이다.

2. 이때 shaker를 이용하면 침투가 쉽게 된다.

3. 침투의 실제

Propylene oxide: epon = 2 : 1 (또는 3 : 1) 30-60 min

1 : 1 30-60 min

1 : 2 3hr.-over night

0 : 1 2hr.

3) 포매제의 구비조건

1. 세포성분의 유출능이 거의 없어야 한다.

2. 탈수제, 치환제 등에 쉽게 녹아야 한다.

3. 점도가 낮아 조직내의 침투가 용이 하여야 한다.

4. 중합 (polymerization) 과정시 부피의 변화가 거의 없어야 한다.

5. 관찰시 전자 beam에 안전 하여야 한다.

6. 절편 제작이 쉽고, 균일 하여야 한다.

7. 절편이 얇게 되고, 염색성이 좋아야 한다.

4) 포매제의 종류

1. 불수용성 포매제 (water-immiscible media)

Methacrylate : 현재 거의 사용하지 않음

Polyester resin : epoxy resin 과 비슷한 성질

Epoxy resin : 현재 가장 널리 사용되는 우수한 포매제 염색성우수, 전자선에도 잘 견딤.

2. 수용성 포매제 (water-miscible media)

Durcupan, Glycol methacrylate, Gelatin, Poly ethylene glycol 등이 있음.

5) 포매제의 구성 (Epoxy resin 을 기준으로 함)

1. 포매제 : Epon 812

2. 경화제 (hardner) : DDSA (Dodecenyl succinio anhydride)

NMA (Nadic methyl anhydride)

3. 가속제 (accelerator) : 포매제와 경화제의 반응을 촉진시킨다.

DMP-30 (Tridimethyl amino-methyl phenol) 이 사용

6) 포매제의 혼합 (Epon mixture)

A 액 B 액

Epon 812 - 100gm Epon 812 - 100gm

DDSA - 112gm NMA - 75gm

1. A, B 액을 만들어서 보관하여 두었다가 포매시 혼합하여 사용한다.

2. A 액은 연(soft)하며, B 액은 경(hard)하므로 이들 혼합비를 조절하여 온도 조건에 따라 사용한다.

3. 일반적으로 여름철에는 경한 편으로, 겨울철에는 연한 편을 사용하나 각 실험실마다 온도 조건에 따라서 혼합비가 달라진다.

4. A : B 액의 혼합액에 가속제 (DMP-30) 를 1.5-2% 비율로 섞어서 사용한다.

5. 특히 DMP-30 혼합시 불균일하게 혼합되면 침투도 불균일해지며 block 의 질도 떨어지고, 초박절편 제작이 어렵게 된다.

6. 가급적 온도는 20-25°C, 습도 50% 이하에서 포매하는 것이 좋고, 사람에 따라서 allergy 가 일어나는 사람도 있으니 포매시 비닐장갑을 착용한다.

7) 중합 (Polymerization)

1. Gelatin capsule, polypropylene capsule, silicon plate 등에 포매한다.

2. 60°C 에서 24-48 시간 중합하는 경우가 있다.

3. 다음과 같이 온도를 조절하여 중합하는 경우도 있다.

35°C : 12hr.

45°C : 12hr.

60°C : 24-48hr.

4. 요즘 cytochemistry 에서 열의 영향을 배제하고자 UV-lamp를 이용하여 중합시키는 방법도 있다.

8) Block 보관

중합이 끝난 block 를 silicagel 이 들어있는 desicator에 보관하여두면 좋다.

V. 절편제작 (Sectioning)

1) 절편제작 과정

1. TEM 관찰시 매우 얇은 절편 (500Å 정도)이 요구되므로 조직이 포매된 block 을 trimming 한다.

2. Ultramicrotome 을 사용하며 절편을 제작한다.

3. 물위에 뜬 절편을 grid에 올려 놓는 과정이다.

2) 유리칼 (Glass knife)

1. 날면이 매우 sharp 하여 초박절편을 만들때 효과적이므로 가장 널리 사용된다.
2. Plier만을 갖고 손으로 만드는 방법도 있으나 대부분 5-10mm 두께의 유리를 knife make 에 넣어 제작한다. (LKB사, Sorvall사, Sunkay사 등)

3) Diamond Knife

1. Glass knife 보다 훨씬 우수하여, 균질한 thin section을 만드는데 좋다.
2. 잘못 다루어서 날이 손상되면 재생하는데 고가의 경비가 요구된다.
3. 사용시 세심한 주의가 필요하며, 초심자는 가급적 사용을 금해야 한다.

4) Grid

1. LM 에서는 slide glass를 사용하듯, EM 에서는 grid 로 절편을 지지한다.
2. 즉 절편을 지지하는 얇은 망으로써 직경 3mm 정도의 원형으로 구멍 수에따라 구분된다.
3. One hole (single), one slot, 100 mesh, 200 mesh, 300 mesh 등이 있으며 실험 내용과 조직에 따라 알맞는 것을 사용한다.
4. 널리 쓰이는 일반적인 grid 는 구리 (copper)로 만들어져 있으며, 실험 내용에 따라 nickel 이나 백금(platinum) 제품도 이용된다.
5. 구멍이 큰 grid (one hole grid, 100 mesh grid 등) 는 얇은 지지막 (support film)을 grid 에 씌워서 사용한다.

5) 절편제작시 구비 조건

1. 온도 (20°C 정도)와 습도 (50% 정도)가 일정하다.
2. Ultramicrotome이 진동을 받지 않는 곳.
3. 공기의 유통이 적고, 분진이 적은 곳.

6) Block의 삭정 (Trimming)

1. 절편을 제작하기에 앞서서 먼저 block의 불필요한 부분을 제거한다.
2. Stereo microscope 아래서 면도칼을 이용하여 실시한다.
3. Knife와 block face 사이에서 block이 균등한 힘을 받아서 section이 용이하게 되며 연속된 절편을 얻을 수 있도록 block의 윗면 (block face)을 사다리꼴로 trimming 한다.
4. 또한 광학현미경 하에서 thin section을 위한 부위 선정시 용이 하도록 사다리꼴로 실시한다.

7) 후절편 (Semithin Section)의 제작

1. Ultramicrotome을 이용하여 일반적으로 두께 0.5-1um 정도로 자른다.
2. 유리봉이나 루프를 이용하여 slide glass위에 절편을 옮긴다.
3. Slide glass를 hot plate (60-80°C)위에서 건조시킨다.
4. 건조된 절편을 염색액 toluidine blue 나 methylene blue 로 염색한다. (hot plate 이용)
5. 광학현미경(LM) 하에서 관찰하여 전자현미경에서 관찰하고자하는 부위를 선정한다.
6. 염색액 제조방법

Toluidine blue Methylene blue

Toluidine blue - 1gm Methylene blue - 1gm

Sodium borate - 1gm Sodium hydroxide - 소량 D. W. - 100ml

D. W. 100ml 에 먼저 sod. borate를 넣어 60-70°C 에서 녹인후, toluidine blue를 넣어 잘 용해한 다음 filter paper에 여과하여 사용한다.

8) 박절편 (Thin Section)의 제작

1. 광학현미경에서 선정된 부위만을 남기고 다시 한번 block을 trimming하여 나머지 부분을 제거한다.
2. 이때 trimming한 부위 (block face)가 너무 넓을 경우에는 박절편을 제작하기에 어려우므로 가급적 작게 trimming한다.
3. 만들어진 절편을 모으기 (collecting)와 전자현미경 하에서의 관찰을 용이하게 하기 위하여 가급적 ribbon 모양으로 절편을 만든다 (그림 8 참조)
4. D. W. 위에 만들어진 thin section의 ribbon을 grid 로 뜬다 (그림 8 참조)
5. Grid와 forceps 사이의 수분을 filter paper로 제거한 후 petridish 또는 grid box에 보관한다.

VI. 전자염색 (Staining)

1) 전자염색의 목적

1. 완성된 section을 전자현미경으로 관찰하기 위해서는 염색을 하여야한다.
2. 전자현미경으로 관찰시 세포나 조직의 미세구조의 관찰을 위해서 중금속을 이용하여 contrast (electron density)를 부여한다.

2) 염색액의 제조

1. 여러가지 염색액이 있으나 현재 일반적으로 uranyl acetate와 lead citrate를 이용한다.

2. Uranyl acetate 염색액의 제조

가. D. W., ethanol 및 acetone등에 3-7%로 녹여서 여러 시간 방치한 후 사용한다.

나. 빛에 분해되기 쉬우므로 갈색병에 넣어서 보관한다.

3. Lead citrate 염색액의 제조

가. Reynold's method

I 액 II 액

Lead nitrate - 1.33gm 1N NaOH - 8ml

Sod. citrate - 1.76gm

D. W. - 30ml

나. I액을 30분정도 완전 용해하면 lead citrate가 된다 (젓빛 색깔).

다. 이때 II액을 가한 후 D. W.를 가하여 total volume이 50ml가 되도록한다.

라. 주사기나 flask에 넣어 냉장고 속에 보관한다.

3) 염색방법

1. 탈수 전에 실시하는 block stain은 1- 2% uranyl acetate를 이용하여 1내지 2시간한다.
2. 보통의 염색방법 으로는 uranyl acetate 를 먼저 염색한 후 lead citrate를 염색하는 double stain 법을 많이 사용한다.
3. 작은 petri dish속에 염색액을 한방울 떨어뜨린후 grid를 완전히 담그거나, 염색액에 위에

띄워서 염색을 한다.

4. 염색시간은 보통 uranyl acetate에는 5-30분, lead citrate에는 5-20분 염색하나 각 실험실마다 시간이 매우 다르다.
5. 시간이 길어질수록 contamination이 증가하므로 알맞는 시간을 정해서 실시한다.
6. 염색이 매우 손쉬운 automatic stainer를 사용하는 실험실도 있다. (카톨릭대 EM실)
7. 염색이 끝난 grid는 D.W.를 담은 작은 beaker을 3개 정도 준비하여 차례대로 담그어서 washing하거나, wash bottle을 이용하여 grid위에 물을 떨어뜨려서 washing하는 방법이 있다.

사진 작업 (Photography) - 요즘은 CCD카메라를 이용하기 때문에 이 내용은 삭제한다.