

## 주사전자현미경 시료제작에 있어서 각종 소화법

경북대학교 의과대학 병리학교실

### 채 종 민

생물 시료를 주사전자현미경으로 관찰하기 위해 서는 금속성 물질과는 달리 생물 시료를 그대로 관찰할 수는 없고 반드시 몇 단계의 과정을 거쳐야 한다. 생물 시료 제작에 있어서 가장 기본적인 사항은 1) 관찰면 노출법, 2) 시료 전조법, 3) 도전법의 3가지이다. 이상의 3가지 사항을 잘 처리하였을 때 좋은 사진을 얻을 수 있는데 반하여 어느 한 단계라도 잘못되면 좋은 사진을 얻을 수 없게 된다.

#### I. 관찰면 노출법

주사전자현미경으로 시료를 관찰한다는 것은 관찰하고자 하는 대상에 전자현미경의 전자총에서 나오는 전자선이 직접 충돌하여 그 결과 방출되는 2차 전자선에 의하여 화상을 얻는다. 따라서 보고자 하는 면을 노출시키지 않으면 안된다. 그리고 노출면을 얻는 동안 인공적으로 표면의 구조가 변하게 되면 곤란하다. 따라서 광학현미경이나 투파전자현미경 관찰과 마찬가지로 생물 조직의 구조를 보존시켜야 한다. 이 과정을 고정이라고 하며 주로 화학적 고정법을 사용하게 된다. 생물 시료 제작에 있어서 가장 중요한 단계가 바로 관찰면 노출로서 이를 실패할 경우 나쁜 시료가 되고 보고자 하는 소견을 관찰할 수가 없게 된다. 관찰의 목적에 따라 적용하는 노출법이 다르며, 또 조직의 고정 방법도 달라지기 때문에 시료 제작에 있어서 첫순서는 관찰 목적을 분명히 결정하는 일이다.

#### 1. 그대로 보는 법

세포의 표면 등을 관찰하는 경우에는 특별한 노출법이 필요하지 않다. 각 종 조직의 표면 구조, 위벽 점막 세포, 기관의 표면에 섬모 관찰, 내이의 소기관 등의 관찰하고자 하는 표면을 그대로 고정하고 시료 제작을 하여 보면 된다. 그러나 생물 시료 표면에 부착되어 있는 여러 가지 이물이나 점액 등

을 어떻게 잘 제거하느냐가 중요한 관건이 된다.

#### 2. 절단하여 관찰하는 법

조직의 내부를 보기 위한 방법이다. 조직의 내부를 보기 위하여 통상 광학현미경이나 투파전자현미경 관찰에서는 철제칼이나 다이아몬드칼 등으로 박질기를 이용하여 박절하게 된다. 그러나 주사전자현미경은 절단면의 표면만을 고배율로 관찰하기 때문에 칼로 절단하여서는 깨끗한 상을 얻을 수가 없다. 관찰하는 목적에 따라 전조된 시료를 절단하는 법(Dry Fracturing, 주로 간세포 표면의 담관 및 담세관을 관찰하기 위함) 또는 동결 할단법(Freeze Cracking, 시료를 액체 질소로 급속 냉각시킨 다음 면도칼로 시료를 할단하여 절단면을 얻는 방법으로 주로 세포내 소기관을 관찰하기 위함) 등이 있다.

#### 3. 소화법

관찰하는데 불필요한 부분을 각종 방법으로 용해시켜 제거하는 방법이다. 대표적으로 세포질내의 소기관을 보기 위하여 세포질내의 여분의 기질 성분을 녹여 제거함으로서 막구조물을 관찰하는 AODO법, 그리고 교원 섬유나 기저막 성분을 제거하여 세포 성분만을 관찰할 수 있게 하는 6N NaOH 소화법 등이 있다.

1) AODO법(Aldehyde prefix osmium-DMSO-osmium method)

—Tanaka K & Mitsushima A(1984)

고정의 기본 원리는 생체의 구조를 그대로 보존하는 것이다. 주로 전자현미경 시료제작에 있어서 화학적 고정에 이용하는 시약은 aldehyde(para-formaldehyde, glutaraldehyde)류의 고정액과 osmium을 사용한다. osmium은 조직의 보존 목적 이외에도 중금속이기 때문에 투파전자현미경 시료에서 상의 명암을 얻게 하는 염색의 효과와 주사전자현미경 시

료에서 전자 흐름의 전도성을 높이는 효과가 있으며, 또 연한 생체 시료를 단단하게 만들기 때문에 투과전자현미경 시료에서 상의 명암을 얻게 하는 염색의 효과와 주사전자현미경 시료에서 전자 흐름의 전도성을 높이는 효과가 있으며, 또 연한 생체 시료를 단단하게 만들기 때문에 시료 전조시 심한 수축이 방지되고 쉽게 부서지지 않게 해 준다. 그리고 osmium은 세포내의 각종 막구조물을 잘 보존해 준다. 그러나 osmium의 최대의 단점은 조직 침투 속도가 매우 느리기 때문에 입체 구조인 조직의 내부에는 고정이 어렵다. 따라서 aldehyde류의 고정액을 병행하여 사용하게 되는데 aldehyde 고정액은 침투 속도가 비교적 빠르고 세포질의 기질 고정에 유리하다.

그 중에서도 paraformaldehyde는 더욱 침투 속도가 빠르기 때문에 투과전자현미경으로 관찰하는 경우보다 훨씬 큰 조직을 다루는 주사전자현미경 시료 제작에서는 흔히 사용된다. 세포내 소기관의 막 구조물을 보기 위하여 이론적으로는 osmium만으로 고정하고 세포내 기질을 소화시키면 된다. 그러나 상기한 바와 같이 osmium은 침투 속도가 느려 내부 구조의 변형이 일어나기 쉽기 때문에 내부 구조물을 보존할 수 있는 정도의 aldehyde로 고정을 하고 세포내 기질을 소화한다. 즉 aldehyde의 과정이 일어나면 소화가 되지 않는다. 소화법의 원리는 세포내의 막구조물을 osmium으로 단단하게 고정해 둔 상태에서 저장액(0.1% osmium)에 방치할 경우 세포내 기질이 녹아 나온다.

#### 〈순서〉 p. 82참조

1. 조직내 혈액 제거 및 관류 고정(05/05 고정액으로 20분), (p. 80참조)
2. 1% osmium으로 조직 고정
3. DMSO(dimethyl sulfoxide, 조직 동결시 얼음 결정화 방지 목적)에 침투 후 액체 질소 동결 할당
4. 0.1% osmium(저장액)으로 침윤 소화(maceration) : 20°C, 72시간 정도
5. 도전 염색, 탈수, 건조, 금속 증착

#### 2) 6N NaOH소화법(NaOH maceration method) —— Takahashi-Iwanaga H & Fujita T (1986)

생물체의 조직은 많은 세포들과 이들 세포를 서로 연결하는 기저막 성분과 교원 섬유 등의 결합 조직들이 서로 얹혀 있다. 따라서 조직 그대로 SEM

으로 관찰하기 곤란한 경우가 많다. 목적하는 세포를 노출시키기 위하여 기저막 성분과 교원 섬유를 제거할 필요가 있다. 이러한 목적으로 여러 가지 방법이 시도되었는데 고정된 조직을 고온, 고농도의 염산으로 처리하는 방법(많은 찌꺼기가 발생), KOH에 의한 가수분해, collagenase에 의한 효소 소화(고정한 조직에는 효소 소화력이 극히 미비하여 충분한 효과가 없음) 등이 있으나 NaOH maceration법은 기존의 방법을 개량, 단순화하고 단시간에 단백질을 알칼리 가수분해 해서 비교적 깨끗한상을 얻을 수 있는 방법이다. 또 세포 사이에도 쉽게 떨어지기 때문에 복잡한 상피세포의 측면 구조나 신경세포 등의 관찰에도 용이하다. 교원 섬유의 주성분은 단백질로서 일반 상식적으로는 화학적 가수분해가 모든 단백질에 비특이적으로 작용하게 되겠지만 고정된 조직에서 반응하는 경우 세포와 같은 큰 단백질의 응집괴보다는 가는 섬유조직의 collagen 쪽이 훨씬 빨리 가수분해되기 때문이다.

#### 〈순서〉 p. 83참조

1. glutaraldehyde로 관류 고정 후 같은 고정액으로 1일간 더 침윤 고정
2. 충분히 고정한 조직편을 수세한 후 60°C 6N NaOH에서 가수분해
3. 0.1M 완충액으로 수세
4. 도전 염색, 탈수, 건조, 금속 증착

#### 〈주의점〉

1. 고정은 관류 고정이 최선이나 관류 고정이 불가능할 경우 세척하여 침윤 고정하여도 무방하다. 포르말린에 고정된 조직은 glutaraldehyde에 재고정하는 것이 좋다. 고정은 적어도 3시간 이상 충분히 오래하는 것이 중요하다.
2. NaOH농도가 중요하다. 1N NaOH로서 충분히 오래하여도 6N NaOH 소화법과 같은 효과를 얻을 수는 없다.
3. 온도 유지는 매우 중요하다. 온도가 1~2°C 변하여도 결과에 큰 영향을 미치므로 항온온조에서 정확히 60°C유지하는 것이 중요하다.
4. 최적 반응 시간은 조직의 종류, 동물에 따라 달라진다. 많은 경우 15분 정도이다.
5. 알칼리 처리가 30분 이상이 되면 세포 표면이 부서진다.
6. 침윤 처리 후 수세를 신중하게 한다. 증류수에 수세할 경우 시료의 팽창으로 손상이 커진다.

0.1M PB로 수세하는 것은 어느 정도 팽창을 각오하고 조직 표면에 찌꺼기가 적어지기 때문에 깨끗한 상을 얻을 수 있다.

3) 2N NaOH소화법(Cell-maceration/SEM technique) —— Ohtani O(1992)

6N NaOH 법과는 반대로 교원 섬유를 포함한 결합 조직을 보존하고 기타 세포 성분을 제거하여 결합 조직만을 관찰하기 위한 기법이다. 결합 조직을 노출시키기 위한 세포 성분 용해법으로 acetic acid 법, trypsin법, EDTA 처리법 등 많은 방법들이 응용되었으나 2N NaOH로 처리하는 방법으로 간단하고 효과적으로 세포 성분을 제거할 수가 있다. collagen fiber나 fibrils을 보다 깨끗하게 관찰할 수가 있다.

〈순서〉 p. 84참조

1. 조직을 관류 고정후 1~2일간 침윤 고정
2. 25°C의 2N NaOH용액에 3~7일간 침윤 소화
3. 25°C의 증류수에 3~4일간 처리
4. 도전 염색, 탈수, 건조, 금속 이온 증착
4. 주형 관찰

혈관, 림프관, 생체내의 각종 관구조물의 삼차원적 구조를 관찰하기 위하여 맥관구조내에 수지를 주입한 다음 굳게 하고 이후 굳어진 수지 이외의 모든 조직 성분을 용해 제거하여 주형을 주사전자현미경으로 관찰하는 방법이다.

〈순서〉 p. 85참조

1. 맥관 구조에 도관을 삽입한 후 혈액 성분 등 제거
2. 도관을 통해 주형제 주입  
(Mercox CL-2B와 monomeric methylmethacrylate를 1:1로 혼합)
3. 2.5% glutaraldehyde용액에서 1일 방치
4. 50°C에서 2시간 이상 방치(주형제의 열융합)
5. 10% NaOH로 조직 성분 제거
6. 도전 염색, 탈수, 건조, 금속 이온 증착  
\*4) 5)번 과정 중간에 주형제와 조직파의 관계를 관찰하기 위하여 각종 소화법(6N NaOH 소화법)을 이용할 수 있다.

#### 5. 염색법

특정부를 동정하기 위하여 중금속으로 염색하는 방법

#### 금 표지항체법 등

모든 관찰에 공통되는 고정 방법이라는 것은 없다. 관찰 방법에 따라 초기 조직 고정 방법이 다르기 때문에 관찰 방법을 결정하고 순차적으로 시행하는 것이 중요하다.

## II. 시료 건조법

주사전자현미경으로 시료를 관찰하기 위하여 시료에 포함되어 있는 수분을 시료 형태의 변형없이 건조시키는 것이 필요하다. 생물 시료를 공기중에 그대로 건조시키게 되면 표면 장력에 의하여 시료에 심한 변형이 초래된다.(오징어를 말린 경우와 같이). 시료의 변형없이 건조하는 방법으로는 시료를 계열 알콜로 탈수하고 다음의 2가지 방법으로 건조시킨다.

#### 1. 임계점 건조법(Critical point drying)

생체 시료를 공기중에 건조하면 심한 변형이 초래되므로 표면장력 0이 되는 상태 즉 임계점 이상에서 건조시키는 방법이다. 수분의 임계점 온도와 압력( $37.4^{\circ}\text{C}$ ,  $218\text{kg/cm}^2$ )은 대단히 높기 때문에 액체 이산화 탄소( $31^{\circ}\text{C}$ ,  $72.8\text{kg/cm}^2$ )로 치환한 다음 건조시킨다. 방법 : 계열 에탄올에 탈수한 조직을 휘발성이 적은 isoamyl acetate(전처리액)으로 치환하고 임계점 건조기 내에서 액체 이산화 탄소로 치환한 다음 임계점이상 (약 $40^{\circ}\text{C}$ ,  $90\sim 110\text{kg/cm}^2$ )에서 건조시킨다.

#### 2. 동결 건조법(Freeze drying)

동결 건조법은 탈수된 조직을 급속히 동결시키고 저온 chamber내에서 서서히 진공 펌프로 공기를 빼내면 동결 상태에서 곧바로 기화되므로 조직의 변형없이 건조시키는 방법이다. 동결 온도가 매우 높은 t-butyl alcohol( $25.5^{\circ}\text{C}$ )을 용매로 사용하는 방법 (Inoué T & Osatake H(1988))이 가장 간편하고 결과가 좋다. 방법 : 계열 에탄올에 탈수한 조직을 t-butyl alcohol로 치환하고 급속히 동결시킨다. 동결 조직을 동결 건조기내에서 진공시키면 건조된다.

## III. 도전법

주사전자현미경으로 시료를 관찰할 때에 전자총에서 나온 전자선이 시료 표면에 충돌되면 2차 전자선을 방출하게 된다. 이 2차 전자를 잡아서 영상

을 얻는 방법으로 시료를 관찰하게 되는데 2차 전자 방출 이외의 여분의 전자는 시료와 시료대를 통하여 접지시켜 전류가 흘러 나가게 하여야 한다. 이 때 근본적으로 생물 시료는 전도체가 아니기 때문에 전자가 잘 흐르지 않는다. 여분의 전자가 시료 대를 통하여 흘러 접지되지 않으면 시료 방(specimen chamber)내에서 방전(charge up)되어 목적하는 2차 전자선을 관찰할 수가 없게 된다. 따라서 생물 시료의 표면을 통하여 시료대까지 전도성을 갖도록 처리하여야 한다. 크게 나누어 2가지 방법이 있다.

### 1. 금속 증착

금속의 알갱이를 시료 표면과 측면에 증착하여 시료 표면에 금속 피막을 형성하게 하는 방법이다. 저배율 관찰에서 금속 이온 증착만으로도 관찰이 가능하지만 전자선의 방전없이 관찰할려면 금속 증착의 두께가 충분히 두꺼워야 한다(약 15~20nm). 따라서 깨끗한 상을 얻을 수가 없다. 도전 염색과 병행하는 것이 중요하다.

#### 〈금속 이온 증착의 목적〉

- 1) 시료에 전도성 획득
- 2) 금속막으로부터 다량의 2차 전자 방출 유도
- 3) 전자선으로부터 시료 보호

금속 증착에 전도성만 생각하면 carbon이나 aluminum이 좋으나 2차 전자 방출의 증가 목적으로 입자성이 있는 금속을 사용하는 것이 좋다. 금, 백금, 금합금, 백금합금 등 작은 크기의 입자를 도전 염색한 시료에서는 3~4nm정도 얇게 증착하면 충분하다.

### 2. 도전 염색

생물 시료 내부에 전도성을 얻게 하는 방법이다. osmium이 중금속이므로 조직내의 막구조물에 osmium을 많이 부착시키는 것이 목적이다. 그리고 도전 염색은 시료의 전도성을 높이는 효과 뿐만 아니라 다른 부가적인 효과도 있다.

#### 〈도전 염색의 목적〉

- 1) 시료의 전도성 상승
- 2) 금속 증착시 피막의 두께를 감소시킬 수가 있기 때문에 깨끗한 상을 얻을 수 있다(시료의 분해능을 증가시킨다).
- 3) 시료의 강도를 높일 수 있다.

시료의 탈수 및 건조시 시료의 수축을 경감시

키며, 금속 증착 중에 시료의 손상이 적게 한다. 또 주사전자현미경 하에서 관찰 중 전자선에 의한 손상을 줄일 수가 있다.

- 4) 오염(contamination)이 적어진다.

#### 〈방법〉

1. 1% OsO<sub>4</sub>에 반응시킨 후
2. 완충액으로 10분 마다 5~6회 수세
3. tannic acid(1~2% 1시간~overnight, 4°C)
4. 수세 2)번 과정과 동일하게
5. 1% OsO<sub>4</sub>에 1시간 반응
6. 수세 2)번과 동일하게
7. 탈수 조작

#### 주사전자 현미경 관찰

1. 전도성이 좋은 시료를 사용한다.  
충분히 건조되고 금속 이온 증착을 한 시료
2. 주사전자현미경의 제반 조건을 적정하게 설정한다.
  - 1) 가속전압 : 가속전압이 높을수록 분해능이 증가하고 전자총에서 방출되는 전자가 많다. 통상 생물 시료 관찰에는 가속 전압 2kV에 둔다.
  - 2) 콘덴사 전류 : 높을수록(숫자가 증가함) 분해능이 좋아지나 시료에 도달되는 전류량은 떨어진다. 물론 관찰하는 배율에 따라 다르나 중간 정도에서 관찰하는 것이 무난하다.
  - 3) 대물렌즈 조리개 선택 및 정렬 : 조리개에 크기가 작을 수록 분해능이 좋아지고 촛점 심도가 깊어진다. 따라서 일반적인 생물 시료 관찰에는 4번 조리개를 선택한다. 대물 렌즈의 축조정은 무엇보다도 중요하다. 축조정이 안될 경우 정확한 촛점이 맞는 사진을 얻을 수가 없다.
  - 4) 작동거리(working distance) : 작동거리는 대물렌즈와 시료 표면과의 거리를 말하는 것으로 짧아질수록 분해능이 증가하나 촛점 심도는 좁아진다. 따라서 관찰하고자 하는 배율에 따라 작동거리를 달리한다. X 10 이상에서 15mm, X 3,000이상에서 10mm, X 2,000이상에서 5mm를 선택한다.

## 참 고 문 헌

1. 中寺尚志, 濑嶋 明, 山縣 昇, 田中敬一. 超高分解能SEMにおける導電染色法の一考察. 醫生物走査電顯 1988; 17: 63-5.
2. 花木 正史, 鹿島 讓. ラット副腎皮質細胞のミトコンドリア櫛の走査電顯的觀察. 醫生物走査電顯 1985; 14: 112-4.
3. Bozzola JJ, Russell LD. Specimen preparation for scanning electron microscopy, in *Electron microscopy*. Boston, Jones and Barlett Publishers, 1992, pp. 41-63.
4. Inoué T, Osatake H. A New drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: The t-butyl alcohol freeze-drying method. *Arch Histol Cytol* 1988; 51(1): 53-9.
5. Ohtani O. The maceration technique in scanning electron microscopy of collagen fiber frameworks: Its application in the study of human livers. *Arch Histol Cytol* 1992; 55(suppl): 225-32.
6. Takahashi G. Conductive staining method. *Cell* 1979; 11: 114-23.
7. Takahashi-Iwanaga H, Fujita T. Application of an NaOH maceration method to a scanning electron microscopic observations of Ito cells in the rat liver. *Arch Histol Jpn* 1986; 49: 349-57.
8. Tanaka K. High resolution electron microscopy of the cell. *Biology of the Cell* 1989; 65: 89-98.
9. Tanaka K, Mitsushima A. A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. *J Microsc* 1984; 133: 213-22.
10. Zhang SY, Mitsushima A, Inoué T. Capillary network beneath the epithelium of the rat urinary bladder-Scanning electron microscopic study using alkali digestion and vascular corrosion casting. *Yonago Acta Medica* 1992; 35(3): 183-91.

### SEM Process(1)

#### 1. 탈혈용 식염수

0.5% sodium chloride + 0.4% sodium citrate

sodium chloride	0.5g
sodium citrate	0.4g

100ml

#### 2. 관류 고정액

05/05(0.5% GA + 0.5% FA)

25% glutaraldehyde	8ml	4ml	2ml
4% paraformaldehyde	50	25	12.5
M/15 or M/10 phosphate buffer	342	171	85.5
	400	200	100

SEM Process(2)

## Surface structure

**Fixation**

## 1. Prefixation

05/05(0.5% GA+0.5% FA)	over 2 hrs
2. Rinse with 0.1M phosphate buffer (PB)	40 mins × 3 changes
3. Postfixation 1% OsO <sub>4</sub>	2 hrs
4. Rinse with PB	40 mins × 3 changes

**Conductive staining**

5. 2% tannic acid	2 hrs - overnight
6. Rinse with PB	40 mins × 3 changes
7. 1% OsO <sub>4</sub>	2 hrs
8. Rinse with PB	40 mins × 3 changes

**Dehydration**

9. 50% ethyl alcohol	30 mins
10. 70% ethyl alcohol	30 mins
11. 80% ethyl alcohol	30 mins
12. 90% ethyl alcohol	30 mins
13. 95% ethyl alcohol	30 mins
14. 99% ethyl alcohol	30 mins
15. 99% ethyl alcohol	30 mins
16. 2-methyl-2 propanol(t-butyl alcohol)	40 mins × 2 changes
17. Freeze-drying	80 mins
16*. iso-amyl acetate	10 mins × 2 changes
17*. Critical point drying	20 mins

**Mounting**

Coating with Pt-Pd about 6-8 nm

Observation with SEM

SEM Process(3)

Internal structure(AODO method)

**Fixation**

1. Remove of blood with 0.5% sodium chloride and 0.4% sodium citrate
2. Perfusion fixation  
05/05(0.5% GA+0.5% FA) within 20 mins
3. Rinse with 0.1M phosphate buffer 20 mins × 6 changes 2 hrs—overnight
4. Postfixation 1% OsO<sub>4</sub> 2 hrs
5. Rinse with PB 20 mins × 6 changes 2 hrs

**Craking**

6. 25% DMSO 30 mins
7. 50% DMSO 15 mins × 2 changes 30 mins
8. Freeze craking with razor blade
9. 50% DMSO
10. Rinse with PB 10 mins × 6 changes 1 hrs
11. Fixation 1% OsO<sub>4</sub> 1 hrs

**Maceration**

12. 0.1% OsO<sub>4</sub> 2—5 days, 20°C
13. Rinse with PB 10 mins × 6 changes 1 hrs
14. 1% OsO<sub>4</sub> 1 hrs
15. Rinse with PB 10 mins × 6 changes 1 hrs

**Conductive staining**

16. 1-2% tannic acid 2 hrs, at 4°C
17. Rinse with PB 10 mins × 6 changes 1 hrs
18. 1% OsO<sub>4</sub> 30 mins - 1 hrs
19. Rinse with PB 10 mins × 6 changes 1 hrs

**Dehydration**

20. 50% ethyl alcohol 20 mins
21. 70% ethyl alcohol 20 mins
22. 80% ethyl alcohol 20 mins
23. 90% ethyl alcohol 20 mins
24. 95% ethyl alcohol 20 mins
25. 99% ethyl alcohol 20 mins
26. 99% ethyl alcohol 20 mins
27. 2-methyl-2 propanol (t-butyl alcohol) 40 mins × 2 changes 80 mins
28. Freeze-drying
- 27\*. iso-amyl acetate 10 mins × 2 changes 20 mins
- 28\*. Critical point drying

**Mounting**

Coating with Pt-Pd about 2nm

Observation with SEM

## SEM Process(4)

#### Submembranous structure(6 N NaOH maceration method)

### Fixation

1. Remove of blood with 0.5% sodium chloride and 0.4% sodium citrate
  2. Perfusion fixation  
2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.3
  3. Excision and cut
  4. Immersion in the same fixative 3 hrs, RT
  5. Rinse with 0.1M phosphate buffer 20 mins × 6 changes 2 hrs—overnight

### Maceration

6. 6N NaOH maceration about 15 mins, at 60°C  
7. Rinse with PB 20 mins × 6 changes 2 hrs

### Conductive staining

- |                         |                     |               |
|-------------------------|---------------------|---------------|
| 8. 1–2% tannic acid     |                     | 2 hrs, at 4°C |
| 9. Rinse with PB        | 20 mins × 6 changes | 2 hrs         |
| 10. 1% OsO <sub>4</sub> |                     | 2 hrs         |
| 11. Rinse with PB       | 20 mins × 6 changes | 2 hrs         |

### **Dehydration**

- |   |                     |         |
|---|---------------------|---------|
| 12. 50% ethyl alcohol                     |                     | 20 mins |
| 13. 70% ethyl alcohol                     |                     | 20 mins |
| 14. 80% ethyl alcohol                     |                     | 20 mins |
| 15. 90% ethyl alcohol                     |                     | 20 mins |
| 16. 95% ethyl alcohol                     |                     | 20 mins |
| 17. 99% ethyl alcohol                     |                     | 20 mins |
| 18. 99% ethyl alcohol                     |                     | 20 mins |
| 19. 2-methyl-2-propanol (t-butyl alcohol) | 40 mins × 2 changes | 80 mins |
| 20. Freeze-drying                         |                     |         |
| 19*. iso-amyl acetate                     | 10 mins × 2 changes | 20 mins |
| 20*. Critical point drying                |                     |         |

**Dissection** with thin needles under dissecting microscope

## Mounting

Coating with Pt-Pd about 6 – 8nm

### Observation with SEM

SEM Process(5)

Cell maceration/SEM technique(2N NaOH maceration method)

**Fixation**

1. Remove of blood with 0.5% sodium chloride and 0.4% sodium citrate
2. Perfusion fixation  
2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.3
3. Excision and cut
4. Immersion in the same fixative 1 - 2 days, RT
5. Rinse with 0.1M phosphate buffer 20 mins × 6 changes 2 hrs-overnight

**Maceration**

6. 2N NaOH maceration 3 - 7 days, at 25°C
7. Rinse with DW 3 - 4 days, at 25°C

**Conductive staining**

8. 1-2% tannic acid 2 hrs, at 4°C
9. Rinse with PB 20 mins × 6 changes 2 hrs
10. 1% OsO<sub>4</sub> 2 hrs
11. Rinse with PB 20 mins × 6 changes 2 hrs

**Dehydration**

12. 50% ethyl alcohol 20 mins
13. 70% ethyl alcohol 20 mins
14. 80% ethyl alcohol 20 mins
15. 90% ethyl alcohol 20 mins
16. 95% ethyl alcohol 20 mins
17. 99% ethyl alcohol 20 mins
18. 99% ethyl alcohol 20 mins
19. 2-methyl-2 propanol (t-butyl alcohol) 40 mins × 2 changes 80 mins
20. Freeze-drying
- 19\*. iso-amyl acetate 10 mins × 2 changes 20 mins
- 20\*. Critical point drying

**Dissection** with thin needles under dissecting microscope**Mounting****Coating** with Pt-Pd about 6-8nm**Observation** with SEM

## SEM Process(6)

### Corrosing casting of blood vessel

#### **Procedures**

1. Removing of blood(Saline, and then methacrylate monomer occasionally)
2. Perfusion of the casting medium  
(Mercox + methacrylate monomer + polymerizer)
3. Polymerization of the medium(60°C water bath, 6–8 hrs)
4. Corrosion of tissues(10%–20% NaOH, etc.)
5. Washing the cast(hot water)
4. and 5. are repeated until thorough corrosion.
6. Washing in cooled ethanol(99%), for removing deposit of soap

#### **Conductive staining**

7. 1% OsO <sub>4</sub>	2 hrs
8. Rinse with DW	20 mins × 6 changes
9. 1% tannic acid	2 hrs, at 4°C
10. Rinse with DW	20 mins × 6 changes
11. 1% OsO <sub>4</sub>	2 hrs
12. Rinse with DW	20 mins × 6 changes

#### **Dissection of cast** (cutting, freeze fracture, freeze cutting, etc.)

**Dehydration** through a graded series of ethanol.

**Drying** (air-, freeze-, critical point-)

#### **Mounting**

**Coating** with Pt-Pd about 6-8nm

**Observation** with SEM

#### **Casting medium**

- a) methylmethacrylate monomer: low viscosity resin  
(must not include hydroquinon, as a polymerizer)
  - b) "Mercox": high viscosity resin
  - c) MA(polymerizer)
- 1) Before anesthesia, a) and b) are mixed to an optimum viscosity.
  - 2) Just before perfusion, c) is poured into the mixed medium(1–2%)

#### **Importances**

- 1) Completely removing of blood
- 2) Viscosity)(=20 - 50% glycerin solution)
- 3) Within 10 mins, perfusion should be performed.
- 4) Perfusion pressure(under 100 mmHg)
- 5) Thoroughly perfusion of the medium