

냉동초미세박절을 이용한 면역금표지법

서울대학교 의과대학 해부학교실

황 덕 호

=Abstract=

Immunogold Labelling Method by Using Cryoultramicrotomy

Douk Ho Hwang, M.D.

Department of Anatomy, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

The technique of cryoultramicrotomy was introduced by Tokuyasu in 1980. The main processes are conducted at low temperature, so it has an advantage to preserve the antigenicity. The procedures are fixation, infusion of sucrose, cutting, immunolabelling and heavy metal staining.

The advantages of cryoultramicrotomy are the high success rate to label immunogold and short course (less than 2 days), easy to cut with glass knives, because it is performed at low temperature. And it also gives a chance to perform immunohistochemical staining under light microscope.

The disadvantages of cryoultramicrotomy are the high cost (the cryo unit requires around US\$ 50,000), constant supply of cheap liquid nitrogen and technical difficulty(the period of training needs more than 3 months in a case of an expert in electronmicroscopy).

Key Words: Immunogold labelling, Cryoultramicrotomy

서 론

투과전자현미경으로 면역금표지를 시행할 때 반드시 검토해야 할 사항이 몇가지가 있다. 표본이 제작되는 과정부터 항원의 보존에 미치는 요인을 분석하고 최근 많이 이용되는 냉동초미세박절법에 의한 면역금표지법의 장점과 단점을 소개하고자 한다. 마지막으로 냉동초미세박절법에 의한 면역금표지법의 실제 예를 소개하고자 한다.

본 론

투과전자현미경 표본은 반드시 고정(fixation)을 거치는데 일반적으로 많이 사용되는 고정액은 paraformaldehyde와 glutaraldehyde의 혼합용액이다. osmium teroxide는 냉동초미세박절법에 의한 면역금표지법에서는 사용하지 않는다. 고정과정이 불량하면 형태가 불량하고 고정과정이 과다하면 항원성을 소실할 수 밖에 없다. Formaldehyde는 광학현미경 표본 제작용인 것을 회피하여 사용하지 않고 항상 신선한 aldehyde를 얻을 수 있는 paraformaldehyde를 가열 분해하여 사용한다. 시중에 판매되는 formalin은



Fig 1. Immunolabeling of stimulated human lymphocyte. Specimen was cut at -110°C . Anti-vimentin antibody was used and labelled with 6nm-gold particles. Original magnification $\times 40,000$ Bar=100nm N=Nucleus.

안정제로 methanol을 사용하여 전자현미경 고정제로서는 부적합하다. 동시에 사용중인 glutaraldehyde의 pH가 측정해서 5.0 이하라면 정제를 하여 사용한다. 시중에 판매되는 glutaraldehyde는 몹시 불안정하여 보관 및 정제에 관심을 갖지 않으면 형태가 불량하게 된다. 동시에 사용하는 완충액의 삼투압 정도도 고려해야만 한다.

냉동초미세박질법은 1980년 Tokuyasu에 의해 개발된 것으로 액체질소를 사용하여 초저온으로 조직처리를 하여 일반 Epon이나 Lowicryl과 같은 중합시열이나는 포매체에 비하여 항원 보존성이 우수하다. 과정은 조직고정, sucrose 침투, 냉동, 박절, 면역금표지, 그리고 약한 중금속 염색으로 이루어진다.

고정액의 농도는 항원의 성질에 따라 다양하며 4% paraformaldehyde와 0.1% glutaraldehyde의 혼합액이 가장 처음 시도할 때의 농도이고 항원의 보존도가 나쁠 때 glutaraldehyde의 농도를 점차 줄여준다. Glutaraldehyde의 농도를 줄여줄수록 형태의 보존은 나쁘지만 세포막에 부착된 항원과 같이 항원의 양이 적은 표본일수록 감수해야만 한다. 고정시간은 실온에서 1~2시간이면 충분하다. 이후 조직을 2.3M sucrose와 20% PVP(polyvinyl pyrrolidone, 분자량 10,000)를 냉동보호제로 사용하여 2~6시간 침투시킨다.

Sucrose는 시료로 부터 물을 흡수하는 작용을 하여 냉동시 얼음결정에 의해 조직이 파괴되는 것을 방지한다. 20% PVP는 정자은행에서 정액을 열려 보관할 때 보존제로 사용되는 것으로 sucrose를 단독으로 사용할 때 보다 우수한 결과를 준다. 이후에 조직은 옅전도가 나쁜 직경 2mm의 금속핀에 부착시켜 냉동은 1차로 액체 Freon으로 얼린 다음 2차로 액체질소에 냉각시켜 냉동시험관에 넣어 액체질소 용기에 박절하기 전까지 보관한다.

액체 Freon은 액체 질소와는 달리 팽창계수가 낮아 냉동초기에 온도경사를 쉽게 통과할 수 있으며 이후에 비교적 저렴한 가격의 액체질소를 사용한다. 박절은 일반적인 유리칼을 만들어 사용하거나 냉동 전용의 다이아몬드 칼을 사용한다. -70°C 에서 속도 0.5~1.0mm, 200nm의 두께로 잘라 Toluidine Blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하여 적합한 부위를 확인한 후에 초미세박절을 -110°C 이하에서 속도 0.5~1.0mm, 80nm의 두께로 한다. 조직의 회수는 백금루프에 2.3M sucrose용액을 묻혀 가벼운 접촉으로 sucrose 용액이 얼기 전에 빠른 동작으로하면 sucrose 방울의 바닥면에 온도경사에 의해 조직이 달라붙는다. 이것을 Colloidine과 탄소 피막을 입힌 구리나 니켈격자에 조직을 붙여 사용한다. Formvar 피막도

사용이 가능하나 반드시 전기적으로 안정된 탄소 피막을 더 입혀야 면역금의 이온이 전기적으로 흡착이 되어 플라스틱막의 전하와 결합하는 것을 막을 수 있다.

면역금표지는 일반 면역조직화학과 동일하나 항체는 선택시에 주의를 요한다. 가장 이상적인 것은 polyclonal antibody이며 정제는 affinity purified 된 것이며 사용할 때마다 반드시 원심분리를 하여야 한다. 부득이한 경우는 monoclonal antibody를 사용하되 판독시 비특이적 결합을 주의하여야 한다.

면역금표지 과정 중에 절대로 표본이 마르는 것을 피하여야 표면장력에 의해 오는 손상을 막을 수 있으며 완료되면 수세 과정 후 2% Polyvinyl alcohol(Mw. 30,000-70,000)과 0.003% uranyl acetate 혼합용액에 2분간 염색후 과량의 용액을 제거하여 공기중에 말려 Polyvinyl alcohol 중합체를 구성해 표본위에 보호막을 형성하도록 한다.

결 론

냉동초미세박절법의 장점은 초저온으로 조직 처리를 하여 항원 보존성이 우수하여 성공률이 높고 전과정이 2일이면 가능하므로 시간을 절약할 수 있고 초미세박절시에 저온으로 자르기 때문에 유리칼의 경도를 높여 박절 그 자체만은 플라스틱 포매보다 쉽고 플라스틱 포매와 마찬가지로 광학현미경적인 면역조직화학도 가능하다.

냉동초미세박절법의 단점은 적지 않은 시설 투자(기존의 박절기에 부착시 5만불 가량)가 선행되고 실험실에 항상 액체질소를 저렴하게 공급받을 수가 있어야 유지되며 기술적인 어려움으로 양질의 인력이 3개월 이상의 훈련을 거쳐야 시행할 수가 있다는 것이다.

참 고 문 헌

Bernhard W, Leduc EH: Ultrathin frozen sections. I. Methods and ultrastructural preservation *J Cell Biol* 1967; 34: 757-771.

Geiger B, Dutton AH, Tokuyasu KT, Singer SJ: Immunoelectron microscope studies of membrane-microfilament interactions: Distribution of a actinin, tropomyosin, and vinculin in intestinal epithelial brush border and chicken gizzard smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1981; 91: 614-628.

Geuze HJ, Slot JW, Scheffer RCT, van der Ley PA: Use of colloidal gold particles in double labelling immunoelectron microscopy of ultrathin frozen tissue sections. *J Cell Biol* 1981; 89: 653-665.

Griffiths, G: Fine structure immunocytochemistry. Berlin, Spring-Verlag.

Griffiths G, Hoppele H: Quantitation in immunocytochemistry, correlation of immunogold labelling to absolute number of membrane antigens. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 1389-1398.

Keller GA, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ: An improved procedure for immunoelectron microscopy: Ultrathin plastic embedding of immunolabeled ultrathin frozen sections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5744-5747.

Lönnroth A, Skoglund U, Tokuyasu KT, Daneholt B: the adsorption staining technique applied to isolated premessenger ribonucleoprotein particles: a comparison with conventional techniques using electron microscope tomography. *J Microscopy* 1992; 170: 173-182.

Nigg EA, Walter G, Singer SJ: On the nature of crossreactions observed with antibodies directed to defined epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5939-5943.

Singer SJ, Tokuyasu KT, Dutton AH, Chen WT: High resolution immunoelectron microscopy of cell and tissue ultrastructure, in Griffiths J (eds): *Electron microscopy in Biology*, New York, John Wiley & Sons, Vol. 2, pp. 55-106.

Slot, JW, Geuze HJ, Weerkamp AH: Localization of macromolecular components by application of the immunogold technique on cryosectioned bacteria. *Methods Microbiol* 1988; 20: 211-236.

Slot JW, Posthuma G, Chang LY, Crapo JD, Geuze HJ: Quantitative assessment of immuno-gold labeling in cryosections, In Verkleij AJ, Leunissen JLM(eds): *Immuno-gold labelling in cell biology*. Florida, CRC Press Inc., 1989, 00. 135-156.

Slot JW, Posthuma G, Chang LY, Crapo JD, Geuze HJ: Quantitative aspects of immunogold labeling in embedded and in nonembedded sections. *Am J Anat* 1989; 185: 195-207.

Tokuyasu KT: A technique for ultractryotomy of cell suspension and tissues. *J Cell Biol* 1973; 57: 551-565.

- Tokuyasu KT, Singer SJ: Improved procedures for immunolabeling of ultrathin frozen sections. *J Cell Biol* 1976; 71: 894-906.
- Tokuyasu KT: A study of positive staining of ultrathin frozen sections. *J Ultrastruct Res* 1978; 63: 287-307.
- Tokuyasu KT: Immunochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem. J* 1980; 12: 381-403.
- Tokuyasu KT: Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J Microscopy* 1986; 143:139-149.
- Tokuyasu KT: Use of polyvinylpyrrolidone and polyvinyl alcohol for cryoultramicrotomy. *Histochem J* 1986; 21: 163-171.
- Tokuyasu KT: Effects of washing on positive staining. *Acta Histochem Cytochem* 1992; 25: 143-146.
- Tokuyasu K, Ikamura S: A new method for making glass knives for thin sectioning. *J Biophys biochem Cytol* 1959; 6: 305-308.