

## 미세구조적 면역세포화학법을 위한 포매전염색법

가톨릭대학교 의과대학 해부학교실

김 진

=Abstract=

### Preembedding Method for Ultrastructural Immunocytochemistry

Jin Kim, M.D.

*Department of Anatomy, Catholic University Medical College, Seoul, Korea.*

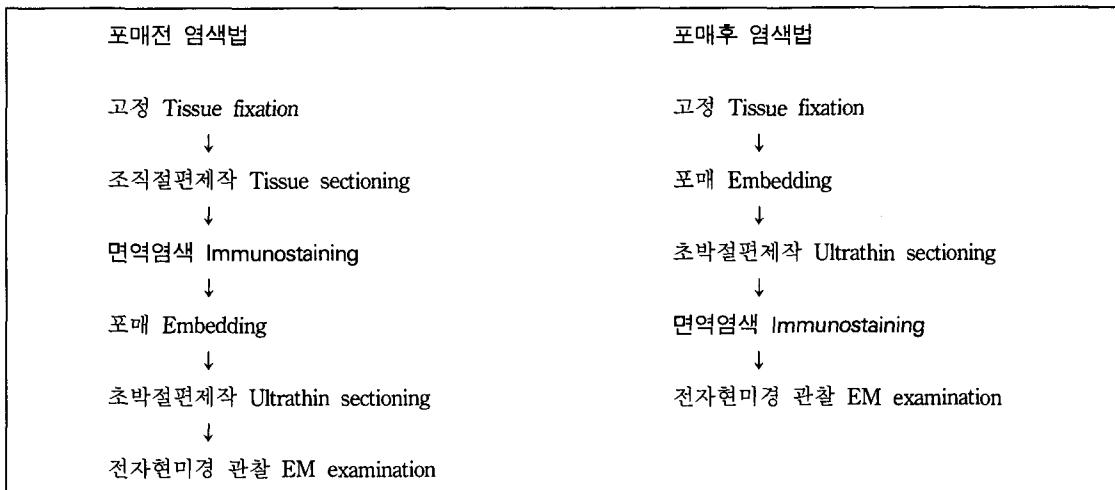
Immunocytochemistry is an important technique for studying location and function of specific proteins and certain other macromolecules such as nucleic acids and polysaccharides in cells and tissues. Immunocytochemistry is based on the coupling of antibodies to specific antigen. Immunocytochemical methods can be divided into two classes, preembedding methods and postembedding methods. Preembedding methods are those in which the cell, or isolated organelle, is labeled before embedding and sectioning. For preembedding method, periodate-lysine-paraformaldehyde, 4% paraformaldehyde, or 4% paraformaldehyde plus 0.1% glutaraldehyde. While the outside layer of the cell may be accessible to antibodies, the labeling of intracellular structures must be preceded by a solvent or detergent(e. g. triton X and saponin) permeabilization step. Optimal staining for primary antibody is generally obtained by overnight incubations at 4°C. For increasing secondary antibody penetration, we use the peroxidase conjugated Fab instead of than the complete IgG. The 3, 3'-diaminobenzidine(DAB) has been widely used as electron donor for ultrastructural. After postfixation with 1% glutaraldehyde and 2% osmic acid, tissue is embedded in Epon 812 using a two-stage flat embedding procedure which allows easier handling of material and correlative microscopic analysis.

**Key Words:** Preembedding method, Ultrastructural immunocytochemistry.

### 서 론

면역세포화학법은 생체에서 일어나는 항원(antigen)과 항체(antibody)의 특이적 결합반응 즉 항원 항체반응(antigen-antibody reaction)의 원리를 이용하여 세포나 조직속에 있는 특정한 단백질이나 핵산 또는 다당류 등 거대분자의 유무와 위치를 알아내는 방법으로서 포매전방법(pre-embedding method), 포매후방법(post-embedding method) 및 동결초박절편

법(frozen ultrathin section technique)의 3가지 방법이 주로 이용되고 있다. 기본 원리는 3가지 방법에서 모두 같고, 포매제와 염색 과정의 순서가 다를 뿐으로서, 사용하고자 하는 항체의 특성과 실험목적에 따라 어느 한 방법을 택하면 된다. 본 논문에서는 포매전염색법의 과정을 중심으로 각 과정에서 주의할 점을 알아보고, 포매전염색법의 장단점을 설명하고자 한다.



### 포매전염색법

포매전염색법은 조직을 합성수지에 포매하기에 앞서 면역염색을 하는 방법으로서 포매후염색법과의 과정상의 차이점은 다음과 같다.

#### 1. 고정

전자현미경적 방법에서 양질의 표본을 얻기 위하여는 조직(세포)의 미세구조를 살아있는 상태와 비슷하게 유지시키며, 인공산물(*artifact*)을 될수 있는 대로 줄여야 한다. 조직을 생체에서 떼어내면 그 순간부터 자가용해가 일어나기 시작한다. 이러한 자가용해를 최소한으로 방지하여 살아있는 상태에 가깝도록 구조를 보존하는 것이 고정의 목적이다. 그러나 전자현미경적 면역세포화학법에서는 올바른 고정법을 택하여 조직이나 세포의 미세구조의 보존 뿐 아니라 항원성도 유지를 하여야 한다. 고정에 영향을 미치는 요소는 고정액의 종류, 고정방법 및 고정시간 등이다.

1) 고정방법에는 액침고정(*immersion fixation*)과 관류고정(*perfusion fixation*)이 있다. 액침고정은 가장 흔히 사용하는 방법으로서 생체에서 조직을 절취하여 고정액속에 담가 고정하는 방법으로서 조직의 크기는  $1\text{mm}^3$ 이내로 하는 것이 좋다. 관류고정은 동물을 마취한 상태에서 심장이나 대동맥을 통하여 고정액을 관류하여 고정하는 방법으로서 중추신경조직, 고환, 신장 등의 고정에 매우 효과적이며, 비교적 큰조직을 vibratome를 이용하여 조직절편을 만들고자 할 때는

고정액의 침투력을 생각하여 관류고정이 필요하다.

2) 고정액은 통상적인 전자현미경법에서 이용하는 paraformaldehyde와 glutaraldehyde 혼합액 대신 4% paraformaldehyde(PBS, pH 7.2), 4% paraformaldehyde 와 0.2% picric acid 혼합액 및 periodate-lysine-paraformaldehyde(PLP)를 흔히 사용한다. glutaraldehyde액을 혼합하는 경우 미세구조의 보존에는 좋으나 항원성의 보존과 항체의 침투력에 문제가 많아 특수한 경우를 제외하고는 사용하지 않는게 좋다. 고정시간은 4% paraformaldehyde를 사용하는 경우는 4°C에서 2시간을 넘지 않는게 좋다. PLP에는 6시간(실온) 또는 12시간(4°C)이면 충분하다. 고정된 조직을 바로 사용하지 않고 보관하여야 할 경우 완충액에 넣어 냉장고에 보관하면 1개월 까지는 보관이 가능하다고 되어 있으나, 저자의 경험에 의하면 4% paraformaldehyde에는 1주일, PLP의 경우 2~3일이 지나면 항원성이 현저히 떨어지며 미세구조의 보존에도 좋지 않아, 좋은 전자현미경사진을 얻기 위하여는 고정 후 바로 면역염색을 시행할 것을 권한다.

#### 2. 조직절편제작

고정된 조직을 포매하지 않고 조직절편을 만들기 위해서는 vibratome이나 cryostat를 흔히 이용한다.

1) vibratome을 이용한 조직절편제작 :  $50\mu\text{m}$  두께의 비교적 얇은 조직절편을 만들 수 있어 광학현미경으로 세포의 모습, 크기 및 분포양상을 관찰하고, 흥미있는 부위를 골라 전자현미경으로 미세구조를 관찰함으로서 서로 연관성 있는 연구를 할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 조직이 비교적 두껍기 때문에 항체가 조직 내로 침투하는 데에 문제가 있고, 또한

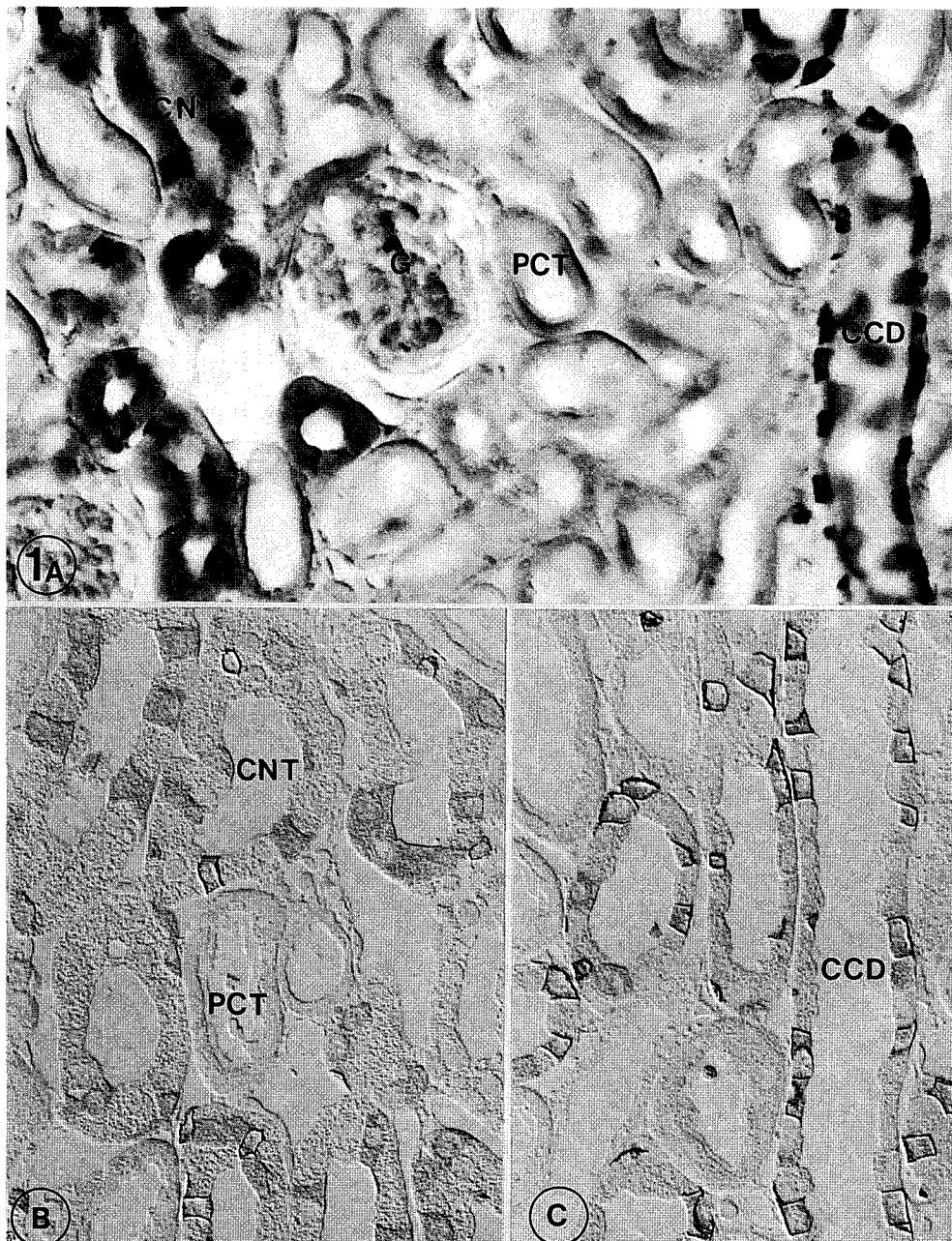


Fig 1. Light micrographs of 50 $\mu\text{m}$  vibratome section(A) and 1 $\mu\text{m}$  plastic sections(B & C) from renal cortex of guinea pig kidney demonstrating  $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$  exchanger immunoreactivity. Immunolabeling is present over basolateral plasma membrane of type A intercalated cells. CCD, cortical collecting duct; CNT, connecting tubule; G, glomerulus; PCT, proximal convoluted tubule. Magnifications; A, x400, B & C, x500.

조직을 고정액이나 buffer 용역에 넣어 오래 보관할 경우 미세구조의 보존이 어렵고 면역성이 떨어져 필요할 때마다 새로운 조직을 제작하여야 한다는 단점이 있다.

2) cryostat 또는 freezing microtome을 이용한 조직절편제작 : 10~50 $\mu\text{m}$  두께의 비교적 얇은 조직절편을 만들수 있어 침투력을 증가시킬 수 있고 필요한 조직을 얼려 보관하여 필요한 시기에 절편을 만들수

### \* 전자현미경용 동결절편 제작을 위한 준비과정

- 3~5분간 관류고정(PLP 또는 4% paraformaldehyde) 한다.
- 조직을  $1\text{mm}^3$ 의 크기로 자른다.
- 작게 절개한 조직을 같은 고정액에 좀더 고정하는데 PLP의 경우 6시간(실온) 또는 12시간( $4^\circ\text{C}$ ), 4% paraformaldehyde의 경우 2시간( $4^\circ\text{C}$ ) 담궈둔다.
- aldehyde기를 제거하기 위하여 50mM NH<sub>4</sub>Cl/PBS에 15분씩 3번 씻는다.
- PBS로 5분씩 3번 씻는다.
- 10% DMSO/PBS에 1시간( $4^\circ\text{C}$ ) 담궈둔다.
- aluminum foil capsule을 만들어 그 속에 OCT를 2방울 떨어뜨린 후 조직절편을 놓고 OCT로 적당히 채운다.
- 2-Methylbutane(Isopentane)이 들어 있는 50ml beaker를 액체질소에 담근다. 이때 액체질소가 beaker 속으로 들어가 Isopentane과 섞이지 않도록 주의한다. Isopentane이 얼면(하얀색으로 변함) 따뜻한 hemostat를 이용하여 가운데 부분을 녹여 조그만 공간을 만든다.
- hemostat로 조직과 OCT가 들어 있는 aluminum foil capsule을 잡고 얼려진 Isopentane속에 만들어 놓은 공간에 30~40초간 담근 후(이때 foil capsule 내로 Isopentane이 들어가지 않도록 주의해야 한다.) 바로 foil capsule을 액체질소에 완전히 담궈 더 얼린다. 이 조직을 freezing vials에 넣어 액체질소통이나  $-70^\circ\text{C}$  냉동고에 보관하고 필요할 때 꺼내 동결절편을 제작한다.

있어 편리한 점도 있으나, 미세구조의 보존을 위해 조직의 크기를  $1\text{mm}^3$ 이하로 하여 얼려야 하기 때문에 넓은 범위를 관찰할 수 없는 단점이 있다.

### 3. 면역염색

일반적으로 간접면역파산화효소법(indirect immunoperoxidase method)을 사용하며 통상적인 ABC법도 가능하다. 다음은 간접면역파 산화효소법을 중심으로 각 과정을 설명하고자 한다.

- vibratome 또는 frozen sections을 0.1M PBS(pH 7.4)로 5분씩 2번 세척한다.
- 조직에 남아 있는 aldehyde기를 제거하기 위하여 50mM NH<sub>4</sub>Cl PBS로 15분씩 3번 세척한다(동결절편은 이미 이 과정을 처리 하였으므로 생략한다).
- 0.05% saponin과 0.2% gelatin 및 ovalbumin or bovine serum albumin/PBS(buffer A)액에 1~4 시간 담궈둔다.

\* 항체의 투과성을 높이는 방법—vibratome을 이용한 조직절편은 두께가 보통  $50\mu\text{m}$  정도로서 위에서 언급한 바와 같이 항체를 조직 깊숙히 침투시켜 반응시키기 위하여는 특수한 처리를 하여야 한다. 일반적으로 detergent를 사용하거나 freeze-thaw법을 사용하며, 때로는 alcohol을 처리하여야 하는 경우도 있다.

- detergent로는 0.25% Triton X-100를 많이 사용하고 있으며, 0.05% saponin 또는 0.5% polyoxye

thylene 9 lauryl ether(polidocanol)를 사용하기도 한다. detergent는 항체의 투과성을 높여주며 반면 미세구조를 파괴시키는 단점이 있으므로, detergent의 사용시간은 항체의 분자량에 따라 다르게 사용하되 되도록 짧게 하여야 한다.

(2) freeze-thaw법은 조직을 30% sucrose액(0.1M PB, pH7.4)에 넣어 완전히 가라 앓을 때까지 담근후, 액체질소에 순간적(약 10초)으로 열렸다. 실온에서 서서히 녹임으로써 조직표면에 작은 균열을 만들어 투과성을 높이는 방법으로서 vibratome으로 조직절편을 만들기 전에 시행한다.

(3) 항체의 종류에 따라 1차항체 처리전에 alcohol ( $30\% \rightarrow 50\% \rightarrow 70\% \rightarrow 80\% \rightarrow 90\% \rightarrow 100\% \rightarrow 90\% \rightarrow 80\% \rightarrow 70\% \rightarrow 50\% \rightarrow 30\%$ 에 각각 10분)로 탈수와 함수과정을 거쳐야 하는 경우도 있다. alcohol 처리는 침투력을 높여주는 효과도 있으나 항원을 노출시켜주는 효과도 있다.

#### 4) 1차항체 처리

1차 항체를 1% ovalbumin 또는 1% bovine serum albumin/PBS용액(buffer B)에 적당한 농도로 희석시켜  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight한다. 1차 항체를 실온에서 1~2시간 처리하여도 되나  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight 하는게 미세구조의 보존과 면역반응의 효과가 더 좋다.

#### 5) PBS 또는 buffer A로 15분씩 3번 세척한다.

#### 6) 2차항체 처리

peroxidase가 결합된 2차항체(Fab fragment)를 buffer B에 1 : 50~1 : 500으로 희석하여 실온에서 1~

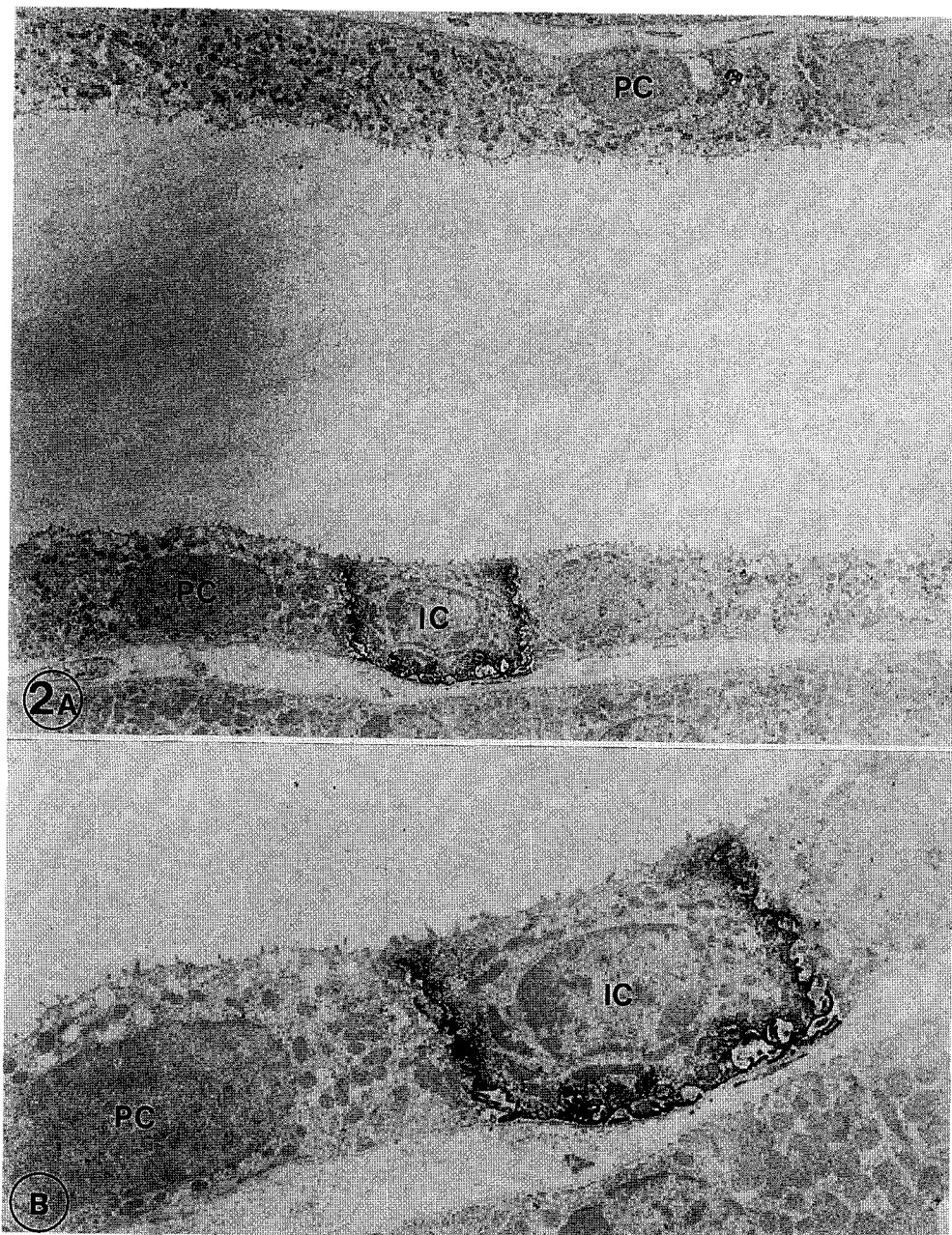


Fig 2. Transmission electron micrographs illustrating  $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$  exchanger immunoreactivity on the basolateral plasma membrane of type A intercalated cells(IC) in the cortical collecting duct of guinea pig kidney. PC, principal cells. Magnification; A, x3,400; G, x6,300.

2시간동안 반응시킨다.

\* 최근에는 조직 투과가 용이한 작은 입자(1nm)의 colloidal gold를 protein A 또는 2차항체에 부착시켜 1차항체에 반응시킴으로서 아래 여러과정을 생략하고 바로 포매한 후 초박절편을 제작하여 전자현미경으로 관찰하기도 한다. 이때 1nm colloidal

gold에 은(silver) 입자를 증착시켜 그 크기를 키워야 관찰이 가능하다.

7) PBS 또는 buffer A로 15분씩 3번 세척한 후 0.05M Tris buffer로 1분씩 3번 세척한다.

8) 발색

0.05M Tris buffer(pH 7.6)에 0.05–0.1% 3,3'-dia-

minobenzidine(DAB)를 만들어 실온에서 5분간 반응시킨 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 최종농도 0.01%가 되게 첨가시켜 10분간 더 발색시킨다.

9) 0.05M Tris buffer와 PBS로 각각 5분씩 3번 세척한다.

#### 10) 후고정

a. 6% glutaraldehyde(in PBS)로 4°C에서 1시간 고정한다.

b. PBS와 0.1M Na cacodylate buffer로 각각 5분씩 3번 세척한다.

c. 1% O<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(in 0.1M Na cacodylate buffer) 4°C에서 1시간 고정한다.

d. 0.1M Na cacodylate buffer로 5분씩 3번 세척한다.

\* 이중염색을 위하여 후고정과정을 생략하고 바로 탈수과정을 거쳐 포매한다.

\*주의 : 후고정과정 중 조직절편이 접히지 않도록 하여야 한다. 특히 1% O<sub>3</sub>O<sub>4</sub>로 후고정하는 과정중에 조직이 접히면 flat embedding시에 조직을 펼수가 없고, 박절편이나 초박절편제작에도 어려움이 따른다. 후고정액에 넣기 전에 조직절편을 붓을 이용하여 완전히 펴고, 후고정액을 서서히 넣는다.

#### 4. 포매 및 초박절편제작

일반 투과전자현미경방법에서와 같은 탈수과정을 거쳐 수지(Epon 812)에 포매하여 필요한 조직부위를 오려내어 바로 포매틀(embedding mould)에 심어 불록을 만들기도 하나, 다음 두단계의 포매과정을 거치는 것이 전자현미경 소견 뿐만아니라 광학현미경 소견을 관찰하는 데 용이하다.

##### 1) flat embedding

silicone을 입힌 유리판 사이에 면역염색된 조직절편을 편편하게 심어 항온기(oven) 속에서 중합시킨다. 유리판을 분리한 다음 조직이 포함된 얇은 수지를 glass slide에 옮겨 놓고 coverslide 덮어 광학현미경으로 관찰하고 필요한 부위를 사진촬영한다. silicone을 입힌 유리판 대신 주위에서 쉽게 구할 수 있는 OHP film을 사용해도 된다.

##### 2) 블록만들기

flat embedding한 조직을 해부현미경으로 관찰하여 미세구조를 보고자하는 부위를 오려내어 빙 block에 순간 접착제로 붙힌 후 초박절편을 제작한다.

#### 5. 관찰

제작된 초박절편을 lead citrate로 대조염색한 후 전자현미경으로 관찰한다.

#### 참 고 문 헌

김 진, 정진웅 : 생명과학 분야에서의 전자현미경의 이용, 가톨릭대학교 대학원 편 : 의학실험 방법론, 서울, 수문사, 1995. pp. 47-64.

손태중 : 병리조직진단에 있어서 전자현미경의 유용성, 대구, 경북대학교 출판부, 1995.

Kim J, Welch WJ, Cannon JK, Tisher CC, Madsen KM: Immunocytochemical response of type A and type B intercalated cells to increased sodium chloride delivery. Am J Physiol 1992; 262: F288-F302.

Lakos S, Basbaum AI: Benzidine Dihydrochloride as a Chromogen for Single- and Double-Label Light and Electron Microscopic Immunocytochemical Studies. J Histochem Cytochem 1986; 34: 1047-1056.

Levey AI, Bolam JP, Rye DB, et al: A Light and Electron Microscopic Procedure for Sequential Double Antigen Localization Using Diamminobenzidine and Benzidine Dihydrochloride. J Histochem Cytochem 1986; 34: 1449-1457.

McLean IW, Nakane PF: Periodate-lysine-parafomaldehyde fixative: A new fixative for immunolectron microscopy. J Histochem Cytochem 1974; 22: 1077-1083.

Priestley JV, Cuello AC: Electron Microscopic Immunocytochemistry for CNS Transmitters and Transmitter Markers. In Cuello AC(eds): *Immunohistochemistry* ed 1. Chichester, John Wiley & Sons, 1984, pp. 273-322.