

## 투과 및 주사전자현미경 영역에서 면역금표지법

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 의과학연구소

권 건 영

=Abstract=

### Immunogold Labelling in the Transmission and Scanning Electron Microscopy

Kun Young Kwon, M. D.

*Department of Pathology, Institute for Medical  
Science, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea*

Immunocytochemistry at the electron microscopic level has allowed the distribution of antigens in the cellular system to be examined. In transmission immunoelectron microscopy, two different approaches have been used, i. e., preembedding or post-embedding methods, depending on whether labeling is carried out before or after the embedding process, respectively. The good preservation and expression of the antigenic molecules in the tissues are most important in the ultrastructural immunocytochemistry. A low temperature resin, Lowicryl K4M for postembedding method is frequently used in many immunoelectron microscopic laboratories. Periodate-lysine-paraformaldehyde(PLP) fixed tissues are dehydrated and embedded at -20°C in a hydrophilic resin, Lowicryl K4M. The resin is easy to section and a good embedding material for preservation of antigenicity in the tissues. Immunogold labelling technique marks localization of antigenic molecules in the subcellular level.

In the scanning immunoelectron microscopy, a silver-enhancing technique can well express the antigenic immunogold particles using smaller gold probes(<15nm) in the standard scanning electron microscopy.

**Key Words:** Post-embedding method, Silver-enhancing, Transmission immunoelectron microscopy, Scanning immunoelectron microscopy.

### 서 론

전자현미경 영역의 면역금표지법(immunogold labelling)에는 전포매법(pre-embedding method), 후포매법(post-embedding method) 및 냉동초미세박절법(cryoultramicrotomy)이 있으며, 이들 방법 중 어느것을 사용하는가는 항원의 분포나 항원의 불안정성 또는

1차 항체의 특성에 따라 결정한다. 면역금표지법을 실시하는데 있어서 중요한 점은 검색할려는 시료에서 가능한 항원성을 보존하는 것이다. 통상적인 전자현미경 시료제작 과정에서는 형태 보존이 뛰어나나 항원 보존이 어려워 별도의 시료제작 방법이 요구되어 있어 항원 발현이 잘 될 수 있는 편리한 방법들이 개발되고 있으며 각 실험실마다 protocol에 다소의 차이가 있다. 특히 고정, 탈수, 침투 및 중합

(polymerization) 과정에서 항원의 소실과 변성이 흔히 초래되는데 이들 과정에서 항원의 보존을 최대한 높이는데 목표를 두고 있다. 항원의 발현을 높이기 위한 1차 항체의 선택과 적절한 희석배율을 정하기 위해선 면역전자현미경적 과정을 거치기 전 광학현미경 면역화학적 방법을 실시하여 얻은 결과를 이용하면 편리하다.

이 연구에서는 투과 및 주사전자현미경적 영역에서 적용할 수 있는 면역금표지법에 관한 기법에 대하여 알아보고자 한다.

#### 후포매법에 의한 면역금표지법

#### Immunogold Labelling by Post-embedding Method

후포매법에 의한 전자현미경 면역금표지법을 실시하는 과정은 I. 포매와 II. 면역금표지 과정으로 나눌 수 있다.

##### I. 포매과정(Embedding procedure)

포매물질의 선택에 따라 시료제작 과정에서 설정되는 실험온도가 달라지는데 크게 상온법과 저온법으로 나눈다.

- 상온법 : LR white를 포매재료로 사용할 때 이용한다. 어느 정도 함수된 상태의 시료에서 침투과정을 실시할 수 있으며 통상적으로 70% 알코올로 탈수한 다음 바로 LR white 침투단계로 들어갈 수 있다. LR white는 상온에서 사용가능하고 신속하고 편리한 장점이 있으나 조직의 형태보존에는 다소 문제가 있다.

- 저온법 : Lowicryl을 포매재료로 사용하는 경우와 냉동치환법(Freeze-substitution)이 있는데 Lowicryl은 탈수에 이어 침투, 포매 및 중합과정을 저온에서 실시하며 시료에서 단백이 소실 또는 변성되는 것을 감소시키는 장점이 있다. 고정에 민감한 반응을 보이는 항원을 가지는 시료에서는 냉동치환법을 사용한다. Lowicryl 사용시 장점은 (1) 형태보존이 용이하고 (2) 항구적인 block을 만들 수 있으며 (3) 대체로 시료제작 과정이 쉽고 값이 싸다. 단점은 (1) aldehyde 고정이 필요하고 (2) 탈수 및 포매단계에서 항원에 영향을 줄 수 있다. Lowicryl K4M (Chemical Werke Lowi GMBH & Co., Germany)을 사용하여 후포매법에 의한 면역금표지법의 과정은 다음과 같다.

##### • 후포매과정의 주요단계(Protocol 1 참조)

## Embedding and Polymerization

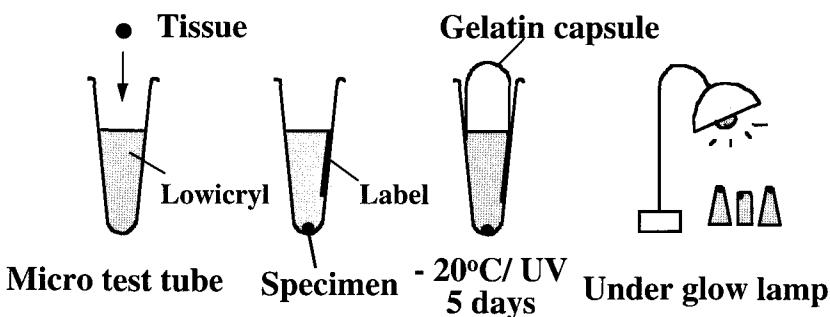


Fig 1. Embedding and polymerization

1. 고정 Fixation
2. 탈수 Dehydration
3. 침투 Infiltration
4. 포매 및 중합 Embedding and polymerization
1. 고정

항원에 따라서 고정액에 의한 영향은 다양하게 나타나며 glutaraldehyde 고정액에 장시간 두어도 항

원성이 보존되는 경우가 있는가 하면 저 농도의 paraformaldehyde에도 항원을 소실하는 예도 있다. glutaraldehyde 고정액을 사용할 경우 1% 이상에서는 항원보존이 어려워 적당치 않다. Paraformaldehyde는 항원의 보존성이 뛰어나며 통상적으로 2% paraformaldehyde와 0.05% glutaraldehyde를 PBS에 혼합하고 고정액을 사용한다. 실험실에 따라서는 periodate-lysine-paraformaldehyde(PLP) 용액을 면역전자현미경

## Lowicryl K4M Working Solution

### Crosslinker A / Monomer B / Initiator C

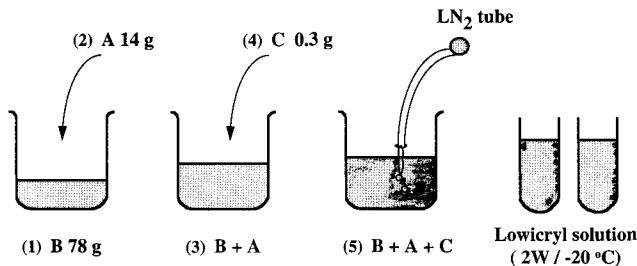


Fig 2. Preparation of Lowicryl K4M Working solution

# Parlodion - Coated Grid Recipe

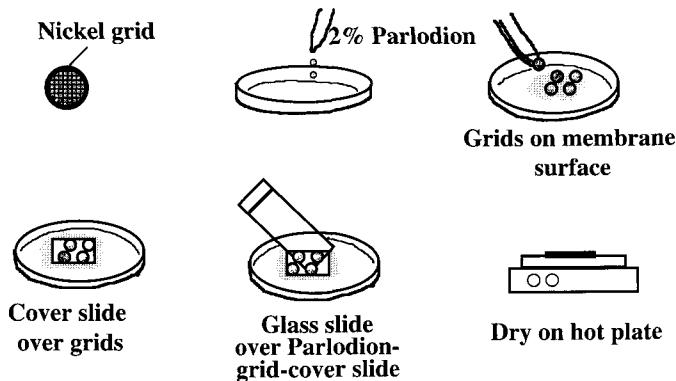


Fig 3. Parlodion-coated grid recipe

\* Periodate-lysine-paraformaldehyde 고정액 제조법  
(100회용kit)

일반적으로 고정시간이 길어질수록 항원발현의 정도가 감소하므로 바로 사용하지 않을 시료(조직)는 고정액에 오랫동안 보관하지 말고 PLP 용액에 고정을 시킨 후에는 0.1M phosphate buffer 용액에 담구어 냉장 보관하면 약 1달 정도 사용가능하다.

## 2. 탈수

계열에 탄올을 사용하여 70% 에탄올부터는  $-20^{\circ}\text{C}$

온도에서 실시한다.

### 3. 침투

Lowicryl K4M 용액을 사용하여 저온에서 저점도 (low viscosity)를 가져 세포의 분자나 항원 구조를 보다 잘 보존할 수 있다. Lowicryl K4M과 100% 에탄올을 1:1 비율로 혼합한 용액에 시료를 넣어 -20°C에서 2일간 방치한 후 Lowicryl K4M 용액만으로 다시 교체하여 같은 온도에서 2일간 둔다. 세포진 시료일 경우 원침하여 상층액인 Lowicryl K4M-에탄올 혼합액은 버리고 Lowicryl K4M 용액만

으로 교체한다.

\* Lowicryl K4M 용액 제조법(101페이지)

• 유의점 : Lowicryl과 에탄올을 혼합할 때는 가능한 가스 bubble이 생기지 않도록 천천히 흔들어 혼합하고, Lowicryl-에탄올 용액은 -20°C에 보관하되 UV에 노출되지 않도록 한다.

#### 4. 포매 및 중합

- 순서

1) Micro test tube에 Lowicryl K4M 용액을 반정도 채운 후 시료를 넣으면 서서히 밑으로 가라앉는다.

2) 고유 EM 번호가 적힌 라벨용지를 micro test tube 내벽측에 붙인 후

3) 젤라틴 캡슐을 꺼꾸로하여 micro test tube 안으로 밀어 넣어 Lowicryl 용액에 완전히 잠기게 하여 외부공기를 차단한다.

4) -20°C에서 UV 등 밑에 시료를 5일간 방치한 후 꺼내어 백열등 밑에서 3~4일간 더 중합시킨다.

• Lowicryl은 파장이 긴 UV에 의해 중합되는 특성이 있으며, UV 강도와 UV 등과 시료와의 거리에 따라 중합되는 정도가 달라진다. 본 실험실에서는 15W의 UV 등을 사용하였고 시료와의 거리는 20~30cm를 유지하였다. Lowicryl은 UV하에서 중합할 때 열을 발생시키므로 열을 억제하기 위해 통상 저온 (-20°C) 상태에서 실시한다.

- 유의점 :

1) 중합이 되기 전 Lowicryl 용액은 황색을 띠나 중합이 충분히 이루어져 block이 딱딱하게 굳으면 무색으로 변한다.

2) Micro test tube를 사용하면 시료를 1개씩 포매하게 되나 플라스틱 well을 사용할 경우 여러 개의 시료를 동시에 포매할 수 있는 장점이 있다.

3) 플라스틱 well 사용시 Lowicryl 용액을 충분히 넣은 후 비닐 wrap으로 덮어 공기를 완전 차단시킨다.

4) Lowicryl block에서 시료가 위치한 부분이 백열등을 향하도록 하여 중합시키고 시료가 있는 부분을 trimming해 주면 중합이 보다 빨리 이루어진다.

#### II. 면역금표지과정(Immunogold labelling procedure)

- 면역금표지과정의 주요단계

1. 초박절 Ultrathin section

2. 전처치 Pretreatment(optional)

3. 차단 Blocking

4. 1차항체 반응 Primary antibody incubation

5. 2차항체 반응 Secondary antibody incubation

6. 은증강법 Silver enhancement(optional)

7. 이중전자염색(Uranyl acetate and lead citrate)

#### 8. 관찰 Observation

##### 1. 초박절

중합이 잘된 Lowicryl block은 epon block과 마찬가지로 초박절이 용이하나 중합이 완전치 못한 경우에는 초박절이 어렵고 면역금표지염색 동안에 잘 부서지는 경향이 있다. 좋은 초박절 편을 얻기 위해선 조심스럽게 trimming하고 block면은 매끈해야 한다.

Lowicryl 초박절편은 epon에 비해 단단하지 못하며 면역금표지염색과 수세과정에서 초박절편이 부서지거나 떨어질 가능성이 높으므로 Formvar 또는 Parlodion을 입힌 니켈 grid에 초박절편을 옮겨 놓는다. 이때 grid의 한 면만 면역염색이 되므로 항원의 함량이 적은 조직에서는 항원 발현정도가 떨어질 수가 있다. Formvar 또는 Parlodion을 입힌 grid는 상품화된 것을 사용할 수 있으나 값이 비싼 편이며 실험실에서 직접 만들어 사용하기도 한다.

\* Parlodion-coated grid제작(101페이지)

• 유의점 : Parlodion 막을 입힌 grid에 탄소로 coating을 하면 항원 단백의 발현을 효과적으로 높일 수 있다.

##### 2. 전처치

0.1% trypsin과 0.1% CaCl<sub>2</sub>를 0.2M tris 완충용액에 녹인 것(pH 7.8)을 사용하여 30분간 반응시키며 이 과정을 생략할 수도 있다.

##### 3. 차단

TBS-T(tris buffer saline-tween 20)에 녹인 1% BSA (bovine serum albumin)로 10분간 반응시켜 1차 항체와 비특이적 결합을 하는 것을 차단한다.

##### 4. 1차항체 반응

TBS-T 용액에 1차항체를 일정한 배율로 희석하여 4시간 반응시킨다.

• 유의점 : 희석배율과 반응시간은 시료나 항원의 특성에 따라 적절하게 조정할 수 있다.

##### 5. 2차항체 반응

Colloidal gold로 배합시킨 2차 항체를 사용하여 1시간 정도 반응시킨다. Colloidal gold 입자의 크기선택은 시료에 따라서, 연구실에 따라 일정치 않으나 적경이 15nm 보다 큰 입자는 검출되기는 쉽지만 크기가 작은 것에 비하여 표지강도(labeling intensity)는 떨어지므로 대체로 10nm 정도 크기를 사용한다. 5nm 보다 작은 colloidal gold를 사용하면 표지효율(labeling efficiency)을 상당히 높일 수 있는 장점이 있으나 검출이 용이하지 않다.

• 유의점 : Parafilm 또는 Fujifilm 위에서 희석된 1차 또는 2차 항체용액을 점적한 후 grid를 떠우거나

담구어 반응시킨다. 이때 점적용량은 약  $10\mu$ 이며 시약이 증발되어 시료가 건조되지 않도록 세심한 주의를 요한다.

#### 6. 은증강법

항원의 발현이 낮은 시료이거나 colloidal gold 입자가 작은 것(5nm)을 사용할 경우 전자현미경상에서 검출이 용이하지 않다. 이런 경우 은증강법을 이용 하며 대개 10nm 정도 크기를 가진 은입자를 약 6분간 반응시킨다.

#### 7. 이중전자염색

시료(조직)의 형태를 유지하고 면역금표지의 정 확한 위치를 용이하게 관찰하기 위해 uranyl acetate로 15분, lead citrate로 4분간 반응시킨다.

- 유의점 : 이중전자염색전 1% O<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 용액으로 약 2분 간 염색하면 조직의 형태학적 소견이 보다 양호해 진다.

#### 8. 관찰(Fig 4)

면역금표지 입자를 용이하게 관찰하기 위해 전자 현미경의 대물렌즈 조리개를 4로 선택하여 해상력을 높인다.

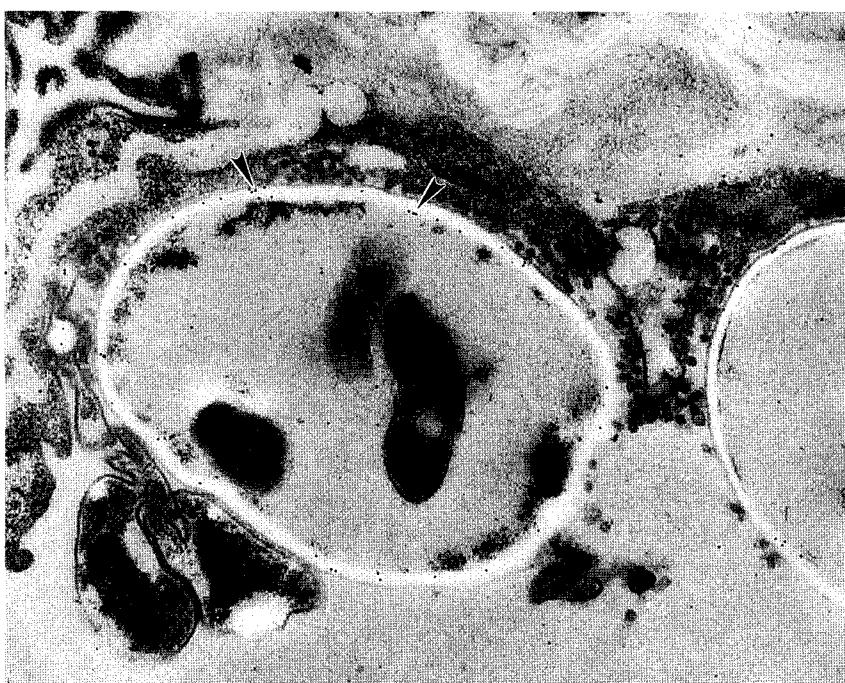


Fig 4. Immunogold particles are well expressed(arrows) on the cyst pellicle of *Pneumocystis carinii*. Transmission immunoelectron microscopy, Primary antibody=902, x 19,000.

#### 1. Periodate-Lysine-Paraformaldehyde(PLP) 고정액 제조법

(1) Stock 용액(냉장보관하며 제조 후 6개월간 사용 가능하다.)

A: 0.2M Lysine-HCl

21.9g lysine hydrochloride/500ml water

B: 0.1M Dibasic sodium phosphate

26.8g NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O/100ml water

(MW=268.1)

C: 8% Paraformaldehyde

Hot plate 위에 비커를 놓고 100ml의 증류수와

8g의 paraformaldehyde를 넣어 혼합하며 온도를 65°C로 올린다. 온도가 떨어진 후 10N NaOH를 서서히 점적(약 15회)하면 용액이 투명하게 된다.

(2) PLP용액(냉장보관하며 제조 후 1주 이내 사용 가능하다)

A: Stock A와 stock B를 각각 75ml씩 비커에 넣어 혼합시키며 10N NaOH로 pH7.4가 되도록 한다.

B: A용액 150ml에 8% paraformaldehyde 50ml를 혼합한다.

C: 혼합액 200ml에 0.43g sodium metaperiodate를

혼합하여 0.01M periodate를 만든다.

## 2. Lowicryl K4M 용액 제조법

### • 상품명 : Lowicryl® K4M

Low temperature embedding medium for EM

Crosslinker A/Monomer B/Initiator C

Chemical Werke Lowi GMBH & Co.

D-W8264 Wald Kraiburg (Germany)

### • 제조법 :

1. 유리 비커에 B용액 78g을 넣은 후 A용액 14g을 넣어 혼합한다.
2. C분말 0.3g을 정확히 측정하여 A+B 혼합용액에 넣은 후 저어 충분히 혼합시킨다.
3. 액체질소 gas를 가는 유리관을 통해 비커내 혼합용액 속으로 주입하여 용액내의 산소를 제거한다.
4. 제조된 Lowicryl 용액은 유리관(또는 유리병)에 넣어 -20°C에 냉동보관하며 약 2주간 사용가능하다.

### 참고사항 :

- (1) 질소 gas를 주입하면 Lowicryl resin 내의 산소농도를 감소시킬 수 있고 Lowicryl 표층을 질소 gas로 덮어서 산소를 차단시킬 수 있다.

산소는 Lowicryl resin이 중합을 일으키는데 방해를 하므로 중합과정이 끝날 때까지는 산소를 차단시킬 필요가 있다.

(2) Lowicryl 제조는 fume cupboard에서 실시한다.

## 3. Parlodion-coated grid 제작법

### • 필요한 시약 및 재료 :

- 1) Parlodion strips 10gm  
Electron Microscopy Science(Cat # 19220)
- 2) Amyl acetate 500ml  
Ted pella, Inc (Cat # 19200)
- 3) Aceton 500ml
- 4) Nickel grid(300mesh)
- 5) Petri Dishes
- 6) Nickel-Plated Forceps
- 7) Glass and cover slides(광학현미경용)

### • 제작순서

- 1) 니켈 grid를 아세톤에 씻은 후 filter paper에 말린다.
- 2) Petri dish에 filtered water를 반정도 넣은 후 2% Parlodion 용액\*을 2방울 정도 떨어뜨리면 퍼지면서 5~10분이 경과하여 petri dish내 물 표면 위에 얹은 막을 형성한다.

\* 2% Parlodion 용액 – 2g Parlodion strips + 50ml amyl acetate + 50ml aceton

상온에서 보관하며 2~3달 정도 사용가능하다.

3) 니켈 grid를 forcep로 꺾어 grid의 덜 반짝이는 막면이 물 위에 만들어진 Parlodion 막 쪽으로 달도록 놓는다. 한번에 10개 정도의 grid를 놓을 수 있다.

4) Cover slide로 가지런히 놓여진 grids 위에 덮는다.

5) Cover slide 위에 유리 slide를 다시 덮어서 물 속으로 눌러 넣으면서 형성된 Parlodion 얇은 막의 변연부가 유리 slide 후면으로 덮이게 해서 parlodion 막-grid-slide-유리 slide 모두를 petri dish 밖으로 들어낸다.

6) Hot plate(50°C)에 놓아 말린다.

7) Parlodion 막이 입혀진 니켈 grid를 한개씩 떼내어 사용하거나 탄소로 얇게 coating을 해서 사용한다.

• 참고사항 : nickel grid 대신 microslide를 사용하여 parlodion 막을 입힌 후 초박절편을 Parlodion-coated microslide 위에 붙여 면역금표지염색 과정을 할 수 있다. 이 경우 uranyl acetate와 lead citrate 염색과정 까지 실시한 후 microslide 막면에 부착된 초박절편을 예리한 칼날로 도려내어 니켈 grid에 올려 놓은 후 건조시켜서 전자현미경적 관찰을 실시한다.

## 주사전자현미경 영역에서 면역금표지법

### Immunogold Labelling in Scanning

### Electron Microscopy

면역주사전자현미경에서 사용하는 면역금표지 입자는 대개 직경이 20nm 보다 큰 것을 사용하고 있다. 그 이유는 15nm 이하의 작은 입자를 사용할 경우 주사전자현미경에서 보편적으로 사용하는 2차 전자상으로는 검출이 힘들고 고해상 주사전자현미경이나 backscattered image가 가능한 주사전자현미경에서 검출이 용이하기 때문이다. 일반적으로 주사전자현미경은 투과전자현미경에 비해 그 해상도가 낮고, 검색하려는 시료의 표면에는 전도성 coating 막을 가지며, 생물시료인 경우 표면에 굴곡이 있으므로 작은 크기의 표지입자를 사용하는 경우 흔히 masking되고, 항원 단백의 양이 적은 경우 발현되는 면역입자를 검출하는 것이 용이하지 않다. 20~40nm의 큰 표지입자를 사용할 경우에는 일반 주사전자현미경으로 검출이 용이하나 표지효율(labeling efficiency)이 떨어지는 단점이 있다. 즉 표지입자의 직경이 커서 1차 항체와 불을 수 있는 수가 감소하고 입자

## 〈Protocol 1〉

**Post-embedding Immunogold Labelling Technique  
(Transmission Immuno-Electron Microscopy, TIEM)**

**I. Embedding procedure**

|   |                    |       |
|---|--------------------|-------|
| 1. Fix in PLP                                       | 6-12 h(over night) | 4°C   |
| 2. Rinse with 0.1M phosphate buffer                 | 2×5min             | RT    |
| 3. Dehydration                                      |                    |       |
| 60% ethanol   | 1×10min            | RT    |
| 70% ethanol   | 1×10min            | -20°C |
| 80% ethanol   | 1×10min            | -20°C |
| 95% ethanol   | 1×10min            | -20°C |
| 100% ethanol  | 2×10min            | -20°C |
| 4. Infiltration                                     |                    |       |
| 1 : 1 Lowicryl/100% ethanol                         | 2day               | -20°C |
| Only Lowicryl                                       | 2day               | -20°C |
| 5. Embedding and Polymerization<br>(under UV light) |                    |       |

**II. Immunogold Labelling Procedure**

|   |                     |  |
|---|---------------------|--|
| 6. Ultrathin section of Lowicryl resin  |                     |  |
| 7. Pretreatment   | 30min               |  |
| 0.1% trypsin+0.1% C <sub>a</sub> Cl <sub>2</sub> in 0.2M tris buffer (pH 7.8) |                     |  |
| 8. Blocking   |                     |  |
| 1% BSA in TBS-T solution  | 10 min              |  |
| 9. Primary antibody incubation  |                     |  |
| 1: 50 in TBS-T solution(Pri Ab=902)   | 4 h                 |  |
| 10. Rinse with TBS-T solution   | 3×2 min             |  |
| 11. Secondary antibody incubation 1 : 50                                      | 60 min              |  |
| incubation in sec. antibody conjugated to colloidal gold                      |                     |  |
| 12. Rinse with TBS-T solution   | 3×2 min             |  |
| 13. Wash with filtered water  | 3×5 min(over night) |  |
| 14. Silver enhancement (optional)   | 6 min               |  |
| 15. Wash with filtered water  | 3×5 min             |  |
| 16. Stain with uranyl acetate   | 15 min              |  |
| Stain with lead citrate   | 4 min               |  |
| 17. Observation (TEM)   |                     |  |

사이에 전기적 반발(repulsion)이 발생한다. 최근 표지입자의 크기가 작은 은증강금(silver enhancing gold) 입자를 생물 시료의 표면관찰에 사용함으로써 크기가 작은 금표지 입자 사용이 가능해 졌으며 면역표지 효율도 높아지고 항원 단백의 검출도 용이하게 되었다(Fig 5). 은증강법을 이용한 면역주사전자현미경적 시료제작 과정은 Protocol 2와 같다.

## ■ Silver-enhancement kit

- 상품명 : Inten SE™M, #RPN 491 (Amersham Corporation, IL 60005, USA)  
Reagent A (Enhancer) 15ml/Reagent B (Initiator) 15ml
- 사용법 : 시약 A와 시약 B를 micro test tube 내에 각각 같은 수(1:1)로 점적한 다음 혼



Fig 5. Silver-enhanced immunogold particles are well detected(arrows) on the surface of trophozoites of *Pneumocystis carinii*. Scanning immunoelectron microscopy, Primary antibody=902, X 17,000.

합하여 즉시 시료 위에 점적하여 약 10분씩 반응시키며 2회 실시한다. 이때 metallic part가 혼합액에 닿지 않도록 하여 은증강 반응이 끝나면 시료를 증류수로 충분히 세척한다.

- 유의점 : 1. 시약 A와 시약 B를 혼합하면 시약의 안정성이 매우 짧은 시간내에 끝나므로 시약을 사용하기 직전에 혼합해야 한다.
- 2. O<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 고정액은 은침착을 제거하는 경향이 있어 은증강법을 실시한 후에는 O<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 고정을 피한다.

#### 참 고 문 헌

##### • Post-embedding Immunogold Labelling

Bendayan M: Protein A-Gold and Protein G-Gold postembedding immunoelectron microscopy, in Haya MA: Colloidal gold: Principles, methods, and applications, Vol I. San Diego, Academic Press INC, 1989, pp. 34-88.

Bendayan M, Zollinger M: Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. J Histochem Cytochem 1983; 31: 101-109.

McLean IW, Nakane PK: Periodate-Lysine-Paraformaldehyde Fixative; A New Fixative for Immunoelectron Microscopy. J Histochem Cytochem 1974; 22: 1077-1083.

Monaghan P, Robertson D: Freeze-substitution without aldehyde or osmium fixatives; Ultrastructure and implications for immunocytochemistry. J Microsc 1990; 158: 355-363.

Monaghan P, Robertson D, Beesley JE: Immunolabelling techniques for electron microscopy, in Beesley JE (ed): immunocytochemistry; A practical approach (ed. 1). Oxford, Oxford University Press, pp. 43-68, 1993.

Newman GR, Jasani B, Williams ED: A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. J Histochem 1983; 15: 543-555.

##### • Scanning Immuno-Electron Microscopy

Danscher G: Localization of gold in histological tissue;

- A photochemical method for light and electron microscopy. *Histochemistry* 1981; 71: 81-88.
- Hyatt AD: Immunogold labelling techniques, in Harris JR: *Electron microscopy in biology: A practical approach* (ed.). Oxford, Oxford University Press, pp. 78-81, 1991.
- Hyatt AD, Eaton BT: Virological applications of the grid-cell-culture technique. *Electron Microscopy Rev* 1990; 3: 1-27.

〈Protocol 2〉

**Immunogold Labelling Technique(Silver enhancement)  
(Scanning Immuno-Electron Microscopy, SIEM)**

|   |            |      |
|---|------------|------|
| 1. Rinse in PBS (0.1M phosphate buffer)                         | 2×5 min    |      |
| 2. Fix in 0.1% Glutaraldehyde                                   | 10 min     |      |
| 3. Rinse in PBS   | 3×5 min    |      |
| 4. Incubate in 1% Normal goat serum                             | 1 h        |      |
| 5. Rinse in PBS   | 2×5 min    |      |
| 6. Incubate on Primary antibody<br>(1 : 100 in PBS, Pri Ab=902) | 1-2 h      | 37°C |
| 7. Rinse in PBS   | 6×3 min    |      |
| 8. Incubate on Protein A-Gold<br>(Amershan, #RPN 439, 15nm)     | 1 h        | 37°C |
| 9. Rinse in PBS   | 6×3 min    |      |
| 10. Post-fix in 2.5% Glutaraldehyde                             | 20-40 min  | RT   |
| 11. Rinse in PBS  | 3×15 min   |      |
| 12. Wash thoroughly in distilled water                          |            |      |
| 13. Silver enhance (Amersham Inten SEM, #RPN 491)               | 2×10 min   |      |
| 14. Wash well in distilled water                                | 2×5 min    |      |
| 15. Fix in 2.5% glutaraldehyde                                  | over night |      |
| 16. Rinse in PBS  | 2×5 min    |      |
| 17. Dehydration and Critical point dry                          |            |      |
| 18. Coat with carbon or aluminum                                |            |      |
| 19. Observation (SEM)   |            |      |