

면역금표지법에 있어서 수지포매 방법에 따른 비교분석

조익현¹, 박창현², 장병화³, 장병준¹

건국대학교 수의과대학¹, 고려대학교 의과대학², 건국대학교 의과대학³

1. 서론

전자현미경 수준에서 항원의 국재(localization)를 증명하기 위한 표본의 제작방법에는 전포매법(pre-embedding method)과 후포매법(post-embedding method)이 있으며. 이 중 후포매법은 수지에 포매한 조직을 초박절편상에서 항원, 항체반응을 시키는 것이다. 그러나, 수지의 종류와 포매방법에 따라 절삭상태, 미세구조의 보존성 및 항원의 보존성에 있어서 상당한 차이가 있다. 본 연구는 상품화된 5가지의 수지에 대한 포매방법에 따른 결과를 비교 분석하였다.

2. 방법

본 연구에는 2 개월된 S/D계통 흰쥐의 소뇌피질을 사용하였고 포매에는 젤라틴캡슐(00 size)을 사용하였다. UV light 중합의 경우 PELCO™ UVC2 Cryo Chamber(USA)를 그리고 열중합의 경우 TAAB Embedding Oven(UK)를 사용하였다. 자세한 방법은 아래의 표와 같다.

| | | | | | |
|---------------|---|--|--|------------------------|--|
| 종류 방법 | LR gold | LR white | Unicryl | Lowicryl K4M | Lowicryl HM 20 |
| 조직 | Cerebellar cortex | | | | |
| 고정 | 4% PFA + 0.5% GA, 12hrs, 4°C | | | | |
| 수세 | 0.02 M PBS, pH7.2 | | | | |
| 탈수 및 치환 | 50%M + 20%PVP 0°C 15min 70%M + 20%PVP -25°C 45min 90%M + 20%PVP -25°C 45min 50%R/50%M + 10%PVP -25°C 30min 70%R/30%M + 10%PVP -25°C 60min 100%R -25°C 60min 100%R + I(I) -25°C 60min 100%R + I(II) -25°C overnight | 50%E RT 10min 70%E RT 10min 80%E RT 10min 90%E RT 10min 95%E RT 10min 100%E(I) RT 10min 100%E(II) RT 10min 100%E(III) RT 10min 100%E : R(1:1) RT 60min 100%R(I) RT 60min 100%R(II) RT 60min 100%R(III) RT overnight | 30%E 0°C 30min 50%E -20°C 60min 70%E -35°C 60min 95%E -35°C 60min 100%E(I) -35°C 60min 100%E(II) -35°C 60min 100%E(III) -35°C 60min 100%E : R(1:1) -35°C 60min 100%E : R(1:2) -35°C 60min 100%R(I) -35°C 60min 100%R(II) -35°C 60min 100%R(III) -40°C overnight | | |
| 중합 방식 | UV light | Heat | UV light | Heat | UV light UV light |
| 중합 | 100%R + I, -25°C, 20~25hrs | 100%R 50°C 20~24hrs | 100%R 4°C 4days | 100%R 50°C 4days | 100%R -35°C ~ -40°C 25hrs 100%R -35°C ~ -40°C 25hrs |
| 절삭 | Ultramicrotome(LKB, 2088V), 200 mesh-nickel grid coated with formbar | | | | |
| 면역 염색 | 동일한 방법으로 면역 염색 실시함 | | | 면역 염색 실시하지 않음 | |
| 전자 염색 | U, 20min L, 5min | U, 15min L, 5min | U, 20min L, 20min | U, 20min L, 5min | U, 20min L, 5min |
| 관찰 | Hitachi, H-600 / 75KV | | | | |

M, methanol; PVP, polyvinyl pyrrollidone; R, resin; I, Iniciator, 0.01% benzile; E, ethanol; RT, room temperature; PFA, paraformaldehyde; GA, glutaraldehyde.