Korean J. Zool. 38:417-425, 1995

적외선 온도감응기를 장착한 마이크로파 고정기에 의한 생체조직 고정효과와 조직화학적 특성

신길상 · 민소연 · 김완종 · 손태호[1]

순천향대학교 자연과학대학 생물학과, [1]공과대학 정보통신공학과

적외선 온도 감응기를 장착한 기존의 마이크로파 고정기의 단점을 보완하기 위해서 주변 온도를 보상할 수 있는 고정기를 개발하였다. 이를 이용하여 흰쥐의 혀, 췌장 및 소장을 고정(물리고정)한 후 몇 가지 염색법을 적용하여 염색성을 관찰하였고, 췌장의 내 · 외분비 세포의 미세구조를 전자현미경으로 검경하였으며 단백질의 양과 bands의 양상을 조사하였다. 또한 이 결과들을 통상적인 화학고정을 시행한 경우와 비교하여 마이크로파에 의한 생체물질의 고정효과를 검증하고 조직화학에 응용될 수 있는지를 조사하였다. 흰쥐 혀의 횡단면을 H-E 염색하였을 경우, 두 고정법에서 염색성은 유사하였으나 물리고정에 비해 화학고정에 의한 관찰된 조직은 근육층의 분리가 관찰되었다. 췌장조직을 Feulgen 반응을 이용하여 염색하였을 경우, 물리고정한 군에서 반응산물이 보다 명확하게 관찰되었으며, 십이지장 융모에서 PAS 반응에 의한 염색성도 물리고정의 경우에서 배상세포에 특이적으로 강하게 나타났다. 물리고정을 한 후 짧은 시간동안 2차로 화학고정했을 경우, 췌장 내 · 외분비세포들의 전자현미경적 미세구조는 막 구조 및 세포소기관이나 분비과립등의 보존상태 등에서 통상적인 화학고정법의 결과와 유사하게 관찰되었다. 물리고정한 시료의 질과 염색성이 우수하다는 사실에 근거하여 단백질 함량을 조사한 결과, 물리고정시 단백질의 추출이 비교적 적은 것으로 조사되었다. 이상과 같은 결과들은 마이크로파로 생체조직을 고정할 경우 대부분의 단백질들의 불용성화가 일어남으로써 미세구조의 고정 및 염색성이 증대되는 것으로 판단되었다.

KEY WORDS: Microwave Fixation, Tongue, Pancreas, Duodenum, Histochemistry, Electron Microscopy, Protein Insolubility

현미경 관찰을 위하여 생체시료를 고정하는 방법으로 aldehyde 계통의 화학고정액을 이용하는 방법이 흔히 사용되고 있다. 이러한 화학고정(chemical fixation)은 고정액에 의해 조직내 용해성 단백질이 변성을 일으키고 불용성 상태로 전환됨으로써 가능해지는데, 이 경우 고정액의 조직내 침투는 확산에 의해 이루어지므로 일정한 고정시간이 요구되며 시료의 크기에 제한이 있을 뿐만 아니라, 세포 구조변화가 야기될 가능성도 제시되어져 왔다. 더우기 고정액의 종류, pH, 온도에 따라 표본 관찰시 조직의 염색정도에 있어서 질적 차이를 보이는 것으로 알려져 있다(Fox *et al.*, 1985). 이러한 단점을 보완하기 위해 냉동절편 방식도 채택되고 있으나 구조 보존력이 약하고 조직의 크기에 제한이 있어서 특수한 목적을 위해 선택적으로 사용되고 있는 실정이다.

1970년 이후 마이크로파(microwave)를 이용한 새로운 조직고정법이 개발되어 응용되어지고 있다. 마이크로파 조사에 의한 생체시료의 고정법은 물리고정법(physical fixation)의 하나로서, 생체시료에 마이크로파를 조사할 경우 조직내 ion들의 전도를 야기시키고 양극성 분자들을 회전시켜 변성을 유도함으로써 고정효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Schmidt *et al.*, 1971; Gordon and Daniel, 1974; Fernand

and Kar, 1987). 마이크로파 조사에 의한 고정은 단백질의 추출을 감소시키고, 빠른 시간내에 고정이 이루어지며 몇몇 염색시약과의 반응속도를 증가시키는 것으로 보고되어져 있다(Hopwood *et al.*, 1984; Haruna *et al.*, 1990). 마이크로파에 의한 조직고정 기작은 열에 의해 고정되는 것으로 알려져 있었으나(Mayer, 1970; Bernard, 1974), 체온 이하의 온도조건에서도 고정효과가 나타나는 것으로 보아서, 열 이외의 또 다른 작용이 있을 것이라는 보고들이 있었으며(Login *et al.*, 1986; Login and Dvorak, 1986; Yasuda *et al.*, 1990; Shin, 1994), 일반적으로 사용되고 있는 마이크로파 오븐(전자 렌지)의 경우 조사시간만을 조절할 수 있게 제작되어 있어서 고정시 생체시료의 온도를 정확하게 알 수 없을 뿐 아니라 고정효과도 일정하지 않다.

본 연구에서는 마이크로파에 의한 물리고정법을 사용할 때 시료처리가 비교적 신속하고 염색시약과 조직간의 화학반응이 증가된다는 사실을 기초로 하여, 마이크로파 장(field)내의 시료가 받는 온도를 측정하는 비접촉식 적외선 온도 감응기(infrared temperature sensor)를 장착한 마이크로파 고정기를 고안한 바 있으나(Shin, 1994), 보다 정확한 고정온도를 측정하기 위하여 새로운 thermopile을 사용하였고, 이로써 고정시 발생하는 주변온도의 상승 효과를 보상할 수 있는 기종으로 개량하였다. 이 기종을 사용하여 고정에 적절한 온도를 설정하고, 표본을 제작하였을 경우 전체 표본제작 과정을 수 시간내로 단축할 수 있었다. 즉 화학고정과 물리고정에 의한 조직표본의 염색 특징과 구조 보존상태를 비교하기 위해 흰쥐 췌장, 혀조직 및 소장의 융모부위 등을 몇 가지 염색법으로 조사하였고, 더불어 전자현미경 표본제작에도 응용하였다. 또한 이와 같은 효과는 고정 전후의 시료내 단백질의 양이나 분포 등과 관계가 있을 것으로 사료되어 이들을 비교하였던 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 실험동물은 Sprague-Dawley 계통의 흰쥐이고, 일정하게 조절된 동물실 내에서 기초사육한 후 희생시켜 췌장, 혀 및 소장을 적출하였다. 실험에 사용된 염색시약들은 Sigma사 제품이었고, 그 외의 시약들은 시판중인 특급 및 GR 제품이었다.

마이크로파 고정기(microwave fixator)

조직고정을 위한 기기로서는 비접촉식 적외선 온도 감응기(infrared temperature sensor)를 장착하여 제작된 마이크로파 고정기(경창사 제품, 한국특허 17702 및 4개국 특허출원)를 개량하여 사용하였다(모델; KC 500 A). 이 기기는 thermopile을 사용하여 보다 정확한 고정온도를 측정하고 고정시 상승하는 고정기내의 온도를 보상할 수 있도록 제작되었다. 고정기의 출력은 500 W이고 10단계 gate에 2단계 신호로 조절이 가능하여 전체 20단계의 조절기능을 갖고 있다. 또한 이 고정기에 장착된 적외선 온도 감응기의 온도 측정편차는 $\pm 1^{\circ}C$이다. 마이크로파 조사 후 시료의 온도는 정밀도가 $\pm 0.1^{\circ}C$인 cromium-nickel thermocouple(Fluke)의 끝을 시료속에 삽입하여 측정하거나 생리식염수의 온도를 측정하여 확인하였다. 이때 생리식염수와 시료의 온도 차이는 $\pm 1^{\circ}C$ 정도였다.

조직 고정 및 현미경 표본 제작

적출된 조직들은 1) 3.5% 중성 포르말린 용액으로 고정한 후, 통상적인 광학현미경 표본제작 방법으로 파라핀 블록을 8 μm의 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin, Feulgen 및 periodic acid Schiff 염색하였다(대조군). 2) 30 ml 생리 식염수내에서 위의 개량형 고정기로써 마이크로파를 조사하여 시료를 고정(온도 28 $^{\circ}C$, 25초)한 후, 파라핀에 포매하여 박절하고 대조군과 동일하게 염색하였다(실험군).

전자현미경 표본은 2.5% glutaraldehyde로 4시간, OsO_4로 1시간 동안 고정한 이후, 통상

적인 전자현미경 표본 제작법으로 초박절편(두께: 60 nm-70 nm)하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하고 투과 전자현미경(JEM 1010)으로 관찰하였다(대조군). 한편 30 ml 생리식염수내에서 마이크로파를 조사하여 고정(온도 28°C, 25초)한 시료는, 화학고정법에 사용된 동일한 고정액으로 각각 35분과 30분 동안 고정하였으며 이후의 과정은 대조군과 동일하게 수행하였다.

단백질 함량과 전기영동 분석

흰쥐 췌장 1 g 씩을 적출하여 고정하지 않은 신선한 조직(정상대조군), 3.5% 중성 포르말린 용액으로 고정한 조직(실험대조군), 30 ml 생리식염수내에서 마이크로파를 조사하여 고정한 조직(실험군)들을 각각 EDTA를 포함한 완충액에서 균질화하고, 원심분리(5,000 rpm, 10분)한 후 중간층을 단백질 시료로 사용하였으며, 단백질 정량은 BSA를 표준단백질로 하여 시행하였다. 전기영동은 SDS-PAGE로 시행하였으며, 표지단백질로는 bovine albumin(66 kd), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kd), carbonic anhydrase(29 kd) 및 lactalbumin(14.2 kd)을 이용하였다.

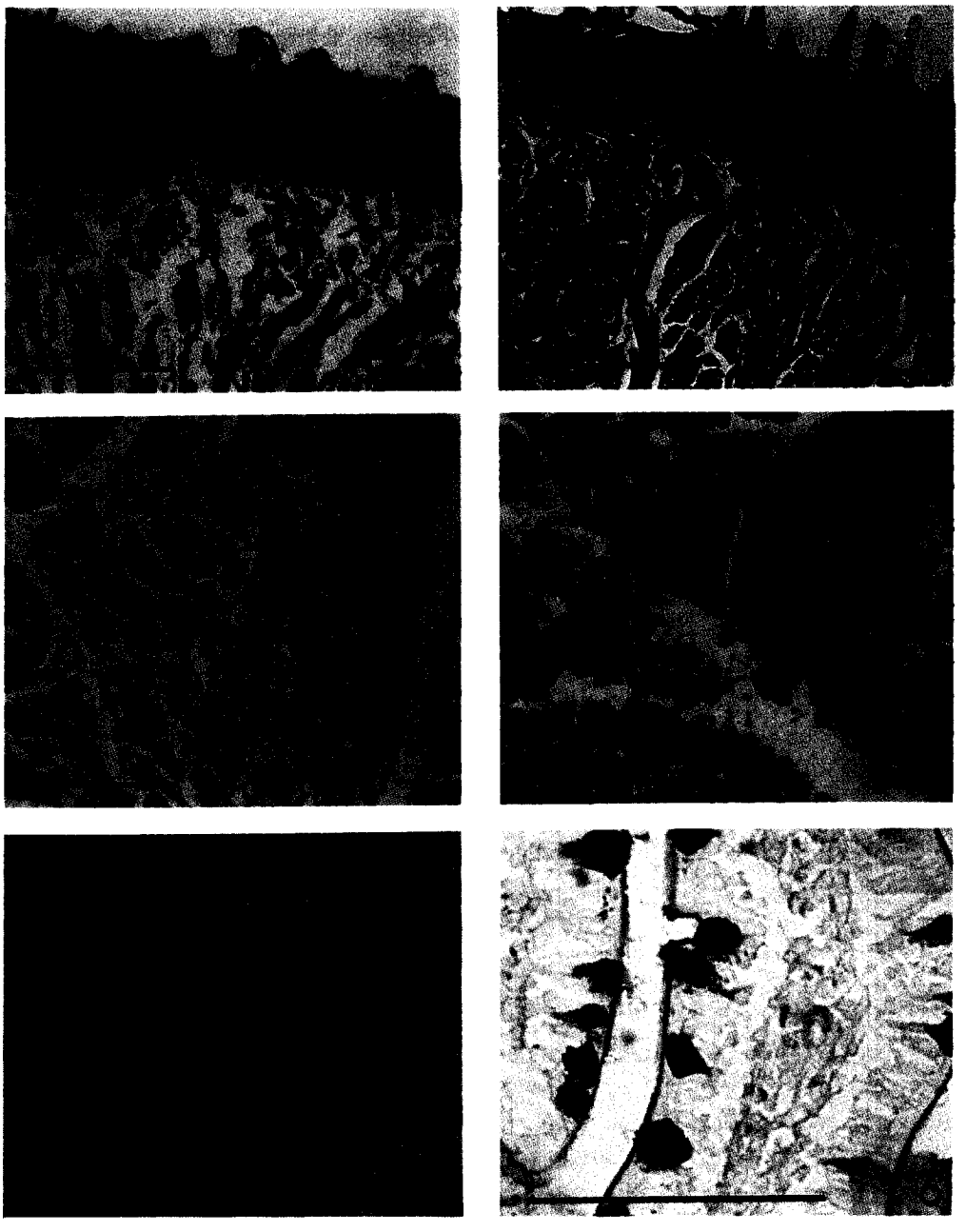
결과

광학현미경적 소견

마이크로파 조사에 의한 조직고정(물리고정) 효과를 포르말린으로 고정(화학고정)한 경우와 비교하기 위해 흰쥐 혀조직, 췌장 및 소장의 십이지장 부위를 몇 가지 방법으로 염색하여 관찰하였다. 혀 횡단면을 hematoxylin과 eosin으로 염색한 조직 표본을 보면, 두 고정법에 의한 염색상태가 모두 양호한 편으로 상피층, 고유층 및 근육층으로 대별되었으며, 물리고정한 표본의 경우에서 근섬유간 결합이나 근속(muscular fasciculus) 사이의 공간이 좁게 나타나 화학고정한 군에 비해 결합조직들의 보존상태가 양호한 것으로 판단되었다(Figs. 1, 2). 췌장을 Feulgen 반응을 이용하여 염색한 후 관찰한 결과, 물리 및 화학고정법에서 공통적으로 외분비 기능을 수행하는 포상선과 내분비 기능을 수행하는 랑게르한스 섬(islet of Langerhans) 등의 구조가 뚜렷하게 구별되고 있었으나, DNA와의 반응산물은 물리고정법을 사용한 군에서가 보다 명확하게 나타났다(Fig. 3, 4). 십이지장의 융모 부위에서 periodic acid-Schiff 반응으로 다당류의 분포를 확인하였는데, 반응산물들은 융모 상피의 일부세포들에 제한되어 양성으로 나타났다. 화학고정한 군에서는 반응산물들이 확산되어 분포하는 경향을 보이는데 비해, 물리고정한 군에서는 배상세포(goblet cell)들에 특이적으로 반응되는 것을 관찰할 수 있었다(Figs. 5, 6).

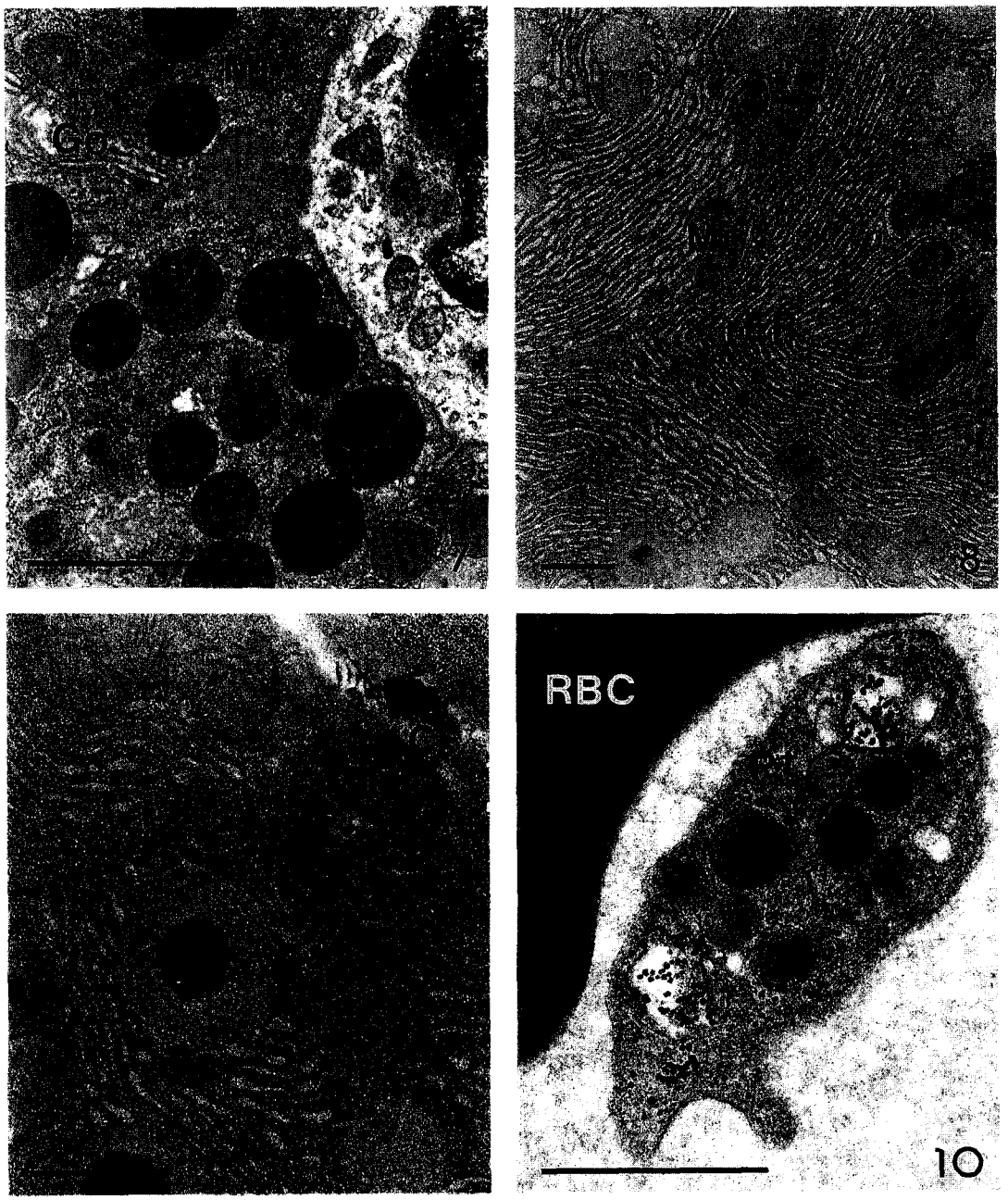
전자현미경적 소견

마이크로파 조사에 의해 세포의 미세구조가 적절하게 고정되는지의 여부를 알아 보기 위해 흰쥐 췌장을 마이크로파로 고정(28°C, 25초)한 후 짧은 시간동안 화학고정을 추가로 실시한 군과 통상적인 방법(화학고정)만으로 제작된 군을 비교하였다. 췌장은 주로 외분비세포인 포상선세포와 내분비세포들, 세포들간 결합조직이나 혈관들이 분포하였다. 화학고정한 경우 포상선을 구성하는 외분비세포들의 미세구조를 보면, 포상선 중앙의 강소쪽으로 미세융모들을 형성하고 있었고, 구형의 핵은 세포 기저쪽에 분포하며 세포질내에서 구형 혹은 원통형의 미토콘드리아가 발달하고 있었다. 또한 조면소포체가 잘 발달하고 있으며 골지복합체와 효소원과립들도 다수 존재하고 있었다(Fig. 7). 물리고정 후 화학고정을 짧게 거친 군의 여러 세포들에서도 막구조를 비롯한 대부분의 미세구조의 보존이 잘 이루어진 것으로 나타났다. 외분비세포들내에 조면소포체가 층상으로 배열하고 있거나, 효소원과립들이 집적되어 있었고 강소내로 분비되는 모습도 관찰할 수 있었으며, 원통형의 미토콘드리아내의 능선들(cristae)도 명확하게 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 췌장 내분비세포들 중의 하나인 β-세포의 조면소포체들이 크게 발달하고 있었고, 난형의 미토콘드리아도 크리스테가 발달되어 있었을 뿐만



Figs. 1-6. Rat tissues fixed with 3.5% formalin (Figs. 1, 3, 5) or in microwave field (Figs. 2, 4, 6). Bar: 20 μm. Fig. 1 and 2. Cross section of tongue stained hematoxylin and eosin. Fig. 3 and 4. Pancreas stained with Feulgen reagents. Fig. 5 and 6. Goblet cells of the duodenal villi stained with periodic acid Schiff reagents.

아니라 인슐린을 함유하고 있는 분비과립들도 다수 관찰되었다. 또한 세포 외측에서 콜라겐 섬유의 다발들도 나타났다(Fig. 9). 랑게르한스섬 주변에서는 혈관들도 볼 수 있었고, 혈관내에서 혈액세포들이 존재하고 있었는데, 통상적인 방법으로는 관찰하기 어려운 적혈구는 전자밀도가 높



Figs. 7-10. Rat pancreas fixed with either chemical fixation (Fig. 7) or micrwave fixation method (Figs. 8, 9, 10) for electron microscopy. Bar: 1 μm. Go: Golgi complex, Mi: mitochondrion, Pt: platelet, RBC: red blood cell, SV: secretory vesicle, Z: zymogen granule, rER: rough endoplasmic reticulum.

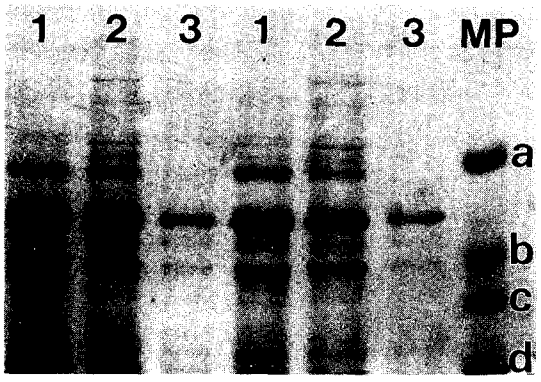


Fig. 11. 10% SDS-PAGE pattern of pancreatic protein followed after various treatments with fixation solutions. Lane 1. Not fixed fresh tissue 2. Microwave fixed tissue 3. 3.5% formalin fixed tissue MP: Lane for marker proteins (a: 66 kd, b: 36 kd, c: 29 kd, d: 14.2 kd).

게 잘 보존되었으며, 혈소판의 분비과립이나 글리코겐 과립들이 뚜렷하게 관찰되는 등, 미세구조 보존 상태가 양호한 것으로 판단되었다(Fig. 10).

단백질 함량과 양상

흰쥐 췌장 조직 1 g을 고정하지 않은 경우(대조군), 3.5% 포르말린으로 고정한 경우(실험대조군) 혹은 마이크로파로 고정(28°C, 25초)한 경우(실험군)의 단백질 함량을 측정한 결과 대조군에서 11.93±0.33 mg인데 비해 마이크로파로 고정한 실험군에서는 13.36±1.33 mg으로 오히려 약간 높게 나타났으며($P<0.05$), 화학고정한 군에서는 단백질함량이 4.87±0.18 mg로서 뚜렷이 낮게 조사되었다. 한편 이 군들에서 단백질 양상의 차이를 알아 보기 위해 전기영동을 실시하였던 바, 화학고정한 군에서는 단백질의 band의 수와 density에 있어서 크게 감소하여 있었으며, 물리고정한 경우에는 오히려 실험대조군의 경우와 유사하게 band의 수와 density가 나타났다(Fig. 11).

고찰

세포나 조직의 내부구조를 현미경으로 관찰하기 위해 거치게 되는 고정 과정은 자가분해(autolysis)를 억제하여 가능한 한 살아있는 상태로 보존하고 표본으로 제작하기 위한 과정이다. 이 경우 화학고정법이 널리 사용되어져 왔는데, 여러 가지 고정액의 종류에 따라 생체물질이 추출되어 고정의 질(quality)에 부정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있어서(Buenett, 1982), 이러한 단점을 보완하기 위한 시도들이 이루어지고 있는 실정이다(Patterson and Bulard, 1980; Mizuhira *et al.*, 1990; Notoya *et al.*, 1990).

마이크로파는 $2\times10^{8}\sim3\times10^{11}$/초의 진동과 $1.5\sim1\times10^{-3}$ m의 파장을 갖는 일종의 전자파로서 알려져 있고, 이 마이크로파가 생체시료에 도달하면 반사되거나 조직속으로 침투 또는 통과하는데, 이때 40% 정도의 에너지가 조직속으로 흡수된다(Login *et al.*, 1987). 또한 마이크로파는 2450 MHz의 진동수를 갖고, 조직속에 수분과 단백질의 극성분자들을 1초에 수십억 회의 주기로 극성을 변화시켜, 분자의 운동에너지가 1,200배나 증가하여 열을 발생하므로써 고정효과를 얻을 수 있다고 알려져 있다(Hafiz *et al.*, 1985; Yamashina *et al.*, 1990). 또한 Hopwood 등(1984)은 마이크로파는 밀집된 분자(unravelled molecule)들의 용해도를 감소시키고 황화물을 형성하므로써 변성이 일어나 고정효과를 나타낸다고 보고한 바 있다. 그러나 본 실험실에서의 예비실험 결과로 보면, 얼음을 채운 비이커속에 시료를 넣고 마이크로파를 조사하여 시료를 고정하여 시료 주위 용액의 온도가 약 8°C였을 때에도 조직의 고정효과는 얼음이 없을 때와 유사하였다. 이러한 결과는 마이크로파 고정이 열 외의 다른 작용에 의하여 고정효과를 나타낼 수 있다는 사실을 뒷받침하는 내용이다. 뿐만 아니라 조직 시료를 마이크로파로 고정할 때 동일한 양의 생리식염수와 시간동안 마이크로파를 조사해도 조직 표면구조, 고정기속의 조직 위치에 따라 시료의 온도는 상이하였으며, 이때에도 일반적인 고정 효과는 있는 것으로 보고된 바 있다(Petrere and Schardein, 1977; Leong and Milios, 1986). 이와 같이 마이크로파에 의

한 조직시료의 고정 기작과 정도를 측정하기 위한 기준이 알려져 있지 않으므로 본 실험에서는 조직시료나 시료 주위 생리식염수의 온도 변화를 측정하므로써 고정 정도를 판단하려고 하였다.

본 실험의 결과로서 마이크로파를 이용한 고정법은 결과에서 본 바와 같이 일반적인 화학고정법에 비교하여 우수한 고정법임을 볼 수 있었으며 조직화학, 생화학실험에도 응용될 수 있다고 생각된다. 마이크로파로 고정한 최적의 실험군은 완충용액 30 ml, 고정시간 25초, 고정온도는 28±3°C에서 고정한 시료였다. 이들 시료는 광학 및 전자현미경적 소견상 구조 보존력, 염색성, 명암의 대조 등에서 3.5% 중성 포르말린에 24-48 시간동안 고정한 대조군의 시료보다 우수하였거나 최소한 동일하였다. 또한 마이크로파를 사용하여 고정할 때는 고정 속도가 대단히 신속하여 고정시간이 초(second) 단위로 종료되고, 시료의 크기에 비교적 제한을 받지 않았으며, 화학 고정액을 사용하지 않았으므로 세척시간, 탈수 및 수화과정에 쓰이는 알코올이나 xylene과 같은 용액을 최소한 줄일 수 있는 등, 경비와 시간이 절약되고, 고정의 질에 직접 영향을 미치는 조직내 단백질이 추출되는 정도가 화학고정에 비교하여 현저하게 적었다. 뿐만 아니라 전자현미경상에서도 막구조 및 세포성분들이 비교적 잘 보존되었던 것으로 보아 마이크로파 고정법이 통상적인 전자현미경 표본제작에도 응용될 가능성을 제시하고 있다.

마이크로파로 고정된 조직 관찰에서 우수한 염색성을 보여주었던 것은 마이크로파 고정 후 시료에 존재하는 단백질의 양과 관계가 있는 것으로 생각된다. 본 실험의 결과에서 보는 바와 같이, 물리고정 후 조직내 단백질의 함량 및 band 양상이 신선한 조직과 비교해 비슷한 결과를 보였으나, 화학고정한 군에서는 뚜렷이 적은 것으로 측정되었다. 즉 마이크로파로 조사된 군에서는 화학고정한 군에 비해 고정시 추출되는 단백질이 거의 없는 것으로 나타났고, 세포구조의 고정효과가 양호하였다. 따라서 이러한 마이크로파에 의한 고정은 조직내 단백질들이 cross-linking에 의해 나타나는 효과라고 여겨진다 (Webber *et al.*, 1980; Chew *et al.*, 1983; Leong and Gilham, 1989). 이러한 마이크로파 고정 효과는 구체적으로 조직시료의 구조 보존, 절편제작, 명암의 대조, 염색시간의 단축등으로 요약될 수 있다. 이러한 결과는 마이크로파 조사시 염색시약의 침투를 촉진하고, 결국 단백질의 양이 염색부위에 영향을 주고, 발색정도에 영향을 주는 요인으로 생각되어진다. 또한 본 실험에서 사용되어진 최적의 고정온도(25~29°C)는 지금까지 보고된 고정온도 중 가장 낮은 온도로서 흰쥐의 체온보다도 낮은 온도였다.

결론적으로 마이크로파에 의한 생체시료의 고정기전이 보다 명확하게 밝혀져야 할 것으로 보이며, 다양한 조직에 적합한 최적의 고정시간과 고정온도가 밝혀진다면 마이크로파에 의한 고정은 현미경 표본제작 과정에서 신속하면서도 우수한 효과를 가지는 방법으로 사료된다.

사사

본 연구는 1994년도 산학협동재단 지원 학술연구조성비에 의해 수행되었음.

인용문헌

Bernard, G.R., 1974. Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation. *Stain Technol.* **49:** 215-224.

Buenett, M.G., 1982. The mechanism of the formaldehyde clock reaction. *Chem. Edu.* **59:** 160-162.

Chew, E.C., D.J. Riches, T.K. Lam, and H.J. Chan, 1983. A fine structural study of microwave fixation of tissue. *Cell Biol. Int. Rep.* **7:** 135-139.

Fernand, M-M.L. and N.L. Kar, 1987. Microwave fixation in diagnostic renal pathology. *Pathol.* **19:** 17-21.

Fox, C.H., F.B. Johnson, J. Hiting, and P.P Rotter, 1985. Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* **33:** 845-853.

Gordon, H.W. and E.J. Daniel, 1974. Preliminary report: Microwave fixation of human tissues. *Am. J. Med. Technol.* **40:** 441-442.

Haruna, N., T. Monden, and M. Morimoto, 1990. Use of rapid microwave fixation technique for immunocytochemical demonstration of tumor necrosis factor, interleukin-1α and interluekin-1β in activated human peripheral mononuclear cells. *Acta Histochem. Cytochem.* **23:** 563-573.

Hopwood, D.G., J. Coghill, G.M. Ramsay, and M. Kerr, 1984. Microwave fixation: Its potential for routine techniques, Histochemistry, immunocytochemistry and electron microscopy. *Histochem. J.* **16:** 1171-1192.

Leong, A.S.Y. and P. Gilham, 1989. A new, rapid microwave-stimulated method of staining melanocytic lesions. *Stain Technol.* **64:** 81-85.

Leong, A.S.Y. and J. Milios, 1986. Rapid immunoperoxidase staining for label lymphocyte antigens using microwave irradiation. *J. Pathol.* **148:** 183-187.

Login, G.R. and A.M. Dvorak, 1986. Microwave energy fixation for electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **34:** 381-387.

Login, R.G., S.J. Schnitt, and A.M. Dvorak, 1987. Methods in laboratory investigation. Rapid microwave fixation of human tissues for light microscopic immunoperoxidase identification of diagnostically useful antigens. *Lab. Invest.* **57:** 585-591.

Mayer, C.P., 1970. Histological fixation by microwave heating. *J. Clin. Pathol.* **3:** 273-275.

Mizuhira, V., M. Notoya, and H. Hasegawa, 1990. New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation. *Acta Histochem. Cytochem.* **23:** 501-523.

Notoya, M., H. Hasegawa, and V. Mizuhira, 1990. New tissue fixation method for cytochemistry by the aid of microwave irradiation. *Acta Histochem. Cytochem.* **23:** 525-536.

Patterson, M.K., Jr. and R. Bulard, and R. Bulard, 1980. Microwave fixation of cells in tissue culture. *Stain Technol.* 55: 71-75.

Petrere, M.K. and J.L. Schardein, 1977. Microwave fixation of fetal specimens. *Stain Technol.* **52:** 1113-1116.

Schmidt, M.J., D.E. Schmidt, and G.A. Robinson, 1971. Cyclic adenosine monophosphate in brain areas: Microwave irradiation as a means of tissue fixation. *Science* **173:** 1142-1143.

Hafiz, S., R.C. Spencer, M. Lee, H. Gooch, and B.I. Duerden, 1985. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. *J. Clin. Pathol.* **38:** 1073-1075.

Shin, K.S., 1994. The fixation effects of biological specimen using microwave oven equipped with infrared-temperature sensor. *Korean J. Zool.* **37:** 144-155.

Webber, M.M., F.S. Barnes, L.A. Seltzer, T.R. Bouldin, and K.N. Prasad, 1980. Short microwave pulses cause ultrastructural membrane damage in neuroblastoma cells. *J. Ultrastruct. Res.* **71:** 321-330.

Yamashina, S., O. Katsumata, and R. Sekine, 1990. Evaluation of microwave irradiation in immunohistochemical reaction. *Acta Histochem. Cytochem.* **23:** 553-562.

Yasuda, K., S. Yamashita, S. Aiso, and Masahide Shiozawa, 1990. Microwave fixation; Examination of temperature in tissues during irradiation. *Acta Histochem. Cytochem.* **23:** 537-551.

(Accepted June 9, 1995)

Fixation and Histochemistry of Biological Tissues Using the Microwave Fixator Equipped with Infrared-Temperature Sensor

Kil-Sang Shin, So-Youn Min, Wan-Jong Kim, and Tae-Ho Son[1] (Department of Biology, College of Natural Sciences and [1]Department of Information and Communication Engineering, College of Engineering, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Asan, Chungnam, 337-745, Korea)

The present study was carried out to investigate the effect of microwave fixation in comparison with that of chemical fixation in preparing the microscopic samples. The microwave fixator was equipped with infrared-temperature sensor, and that was designed to compensate air temperature in the microwave fixator. In the microwave fixation, rat tongue was well preserved in terms of muscular fasciculus and pancreas stained by Feulgen reagents showed clear reaction products in the nucleus. Reaction products by PAS method in duodenal villi appeared specifically at the goblet cells. In electron microscopy, pancreatic cellular components such as secretory granules and collagen bundles were well preserved in both fixations. In aspect of histochemical reaction and electron microscopy, high quality was due to the protein content of microwave fixed specimen. The microwave fixation method saved total duration engaging microscopic preparation.