

전자현미경 시료 제작에 있어 Ultrasonic bath의 유용성에 관한 연구

임 병 수 · 최 정 목* · 강 대 영*

충남대학교병원 전자현미경실, *충남대학교 의과대학 병리학교실

Effect of Ultrasonic Bath in Preparing Specimens for Transmission Electron Microscopy

Byung-Soo Lim, Jeung-Mok Choi* and Dae-Young Kang*

Dept. of Electron microscopy, Chungnam University Hospital

*Dept. of Pathology, Chungnam National University, College of Medicine

(Received July 7, 1998; revised August 21, 1998)

ABSTRACT

The present study was carried out to investigate the effect of ultrasonic bath in tissue preparation for transmission electron microscopy.

The method used standard reagents and media, and employed ultrasonic bath agitation to accelerate fluid exchange.

The liver, kidney, stomach and cardiac muscle tissues of male Sprague-Dawley rats were used for the experiment, and the experimental design was divided into 4 groups; The control group using rotators (Traditional method, 1,625 mins) and the three experimental groups using ultrasonic bath (UB) in the primary fixation through the infiltration processes (UB I; 62.5 mins, UB II; 125 mins, UB III; 250 mins).

The results were as follows;

1. In the control group, tissues were easily sectioned, and showed well preserved intact membranes, and cell organelles such as mitochondria, lysosome, peroxisome, rough endoplasmic reticulum and smooth endoplasmic reticulum.
2. In the UB treated group I, tissues showed holes due to the inadequate removal of both water and fluids used in the dehydration process.
Also the mitochondria of cell organelles, especially, showed swollen intracristal spaces and dense matrices due to poor fixation.
3. In the UB treated group II, tissues showed good preservation of cell organelles and specimen slice sections. Also, no holes were observed.
4. In the UB treated group III, tissues showed leaching of structural components in the cytoplasm, but no holes were observed.

In conclusion, the ultrasonic bath procedure takes approximately 120 minutes from

specimen fixation to resin infiltration and gives excellent results.

Key words : Ultrasonic bath, Specimen Preparation, TEM

서 론

투과 전자 현미경은 의학, 농·생물학 금속 및 재료분야 등 생물 및 무생물 분야에 걸쳐 널리 활용되고 있다. 특히 진단 분야에서는 신장 질환이나 분화가 나쁜 일부 종양의 감별진단에 필수적으로 사용되고 있으며 질병의 진단, 치료 및 경과의 관찰 등에 폭넓게 사용되고 있다(Johannessen, 1973).

투과 전자 현미경의 이용면에 있어 의학 및 생물학 분야에서는 연구와 진단의 효율성을 높이기 위해서는 시료의 정확하고 신속한 처리가 무엇보다 중요하며, 시료 제작 과정에서 유발되는 인공산물을 최대한 방지하여 현미경 검경시 판독에 착오가 일어나지 않도록 하는 것이 중요하다.

투과 전자 현미경적 관찰을 위한 일반적인 표본 제작과정은 광학현미경적 관찰을 위한 시료 제작과 기본적으로 유사하여, 조직의 세절 및 고정, 탈수, 치환, 포매, 박절 및 염색에 이르는 순서는 거의 동일하나, 소요되는 시간은 광학 현미경적 관찰을 위한 시료제작에 비해 제작 과정이 다소 길며, 사용되는 시약들도 고순도의 정제된 시약만을 사용해야 하고 처리 과정에서도 보다 세심한 주의가 요구된다.

통상적인 투과 전자현미경적 관찰을 위한 시료제작 과정에는 시료의 고정, 탈수, 침투, 포매 및 중합의 블록 제작과정 단계와 만들어진 블록의 세절, 염색 및 검경과정 단계로 나누어지며 소요되는 시간은 약 5~6일이 소요된다(Glauert, 1978). 따라서 표본 제작 과정은 많은 시간과 고가의 정제된 시약들이 사용되고 있어, 무엇보다 정확하고 신속한 표본처리법을 개발하여 표본 제작 시간을 단축함으로써 환자 진료 및 의학의 연구에 많은 도움을 주고자 하는 노력이 시도되어 왔다(Nesland 1982; Baic and Baic, 1984; Bencosme and Tsutsumi, 1970).

그러나 병원에서 환자 검체의 신속한 진단을 위해 시료의 처리 과정에서 무리하게 시간을 단축하다 보

면 많은 인공산물이 형성되어 진단에 오류가 생길 수도 있다. 이러한 인공산물의 형성을 방지하기 위해 시료의 크기 조절, 고정액내 첨가물, 온도 조절, microwave나 초음파 같은 기구를 이용한 여러 가지 방법으로 신속한 조직 처리를 통해 시료 제작 시간 단축에 따른 부작용을 최소화 하도록 노력하고 있다(Hafiz *et al.*, 1985; Ian *et al.*, 1991; Giberson and Demaree, 1996). Ian 등(1991)은 초음파를 표본제작에 처음 이용하였는데, 초음파는 초당 20,000 cycle 이상의 진동수를 갖는 역학적 방사에너지로서 이것을 응용한 것이 초음파 세척기로 현재 실험실 및 산업체의 여러 분야에서 이용되고 있다.

본 실험은 초음파의 물리적 성질을 이용하여 인체를 이루는 조직들의 서로 다른 성질에 따라서 초음파를 매개로 해서 용매나 용질의 신속한 조직내 침투를 유도함으로써 고정, 탈수, 치환, 포매제의 조직내 침투 과정에 소요되는 시료 제작 시간을 단축할 때 인공산물의 형성 및 조직의 보존성에 어떤 영향을 미치는가에 대해 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 조직 선정

본 실험에 사용된 실험재료는 외관상 건강하다고 판단되는 Sprague-Dawley계 웅성 백서의 간, 신장, 위 및 심장 조직들을 각각 1 mm³ 크기로 세절한 후 무작위로 10개씩 채취하여 표본제작에 이용하였다.

2) 사용 시약 및 기기

본 실험에 사용된 주요 시약들은 표 1과 같다.

사용 기기들로는 초음파 세척기(ultrasonic bath)는 미국 Branson사 제품(model 2210; 진동수 47 KHz, 출력 80 W의 세척력)을 사용하였고, 표본 절편제작에 사용된 초박절편기(ultramicrotome)는 Soval MT-5000형(미국 Soval사 제품), 투과 전자

Table 1. Experimental reagents

Preparation	Reagent	Product	Product Nat.
Fixation	Glutaraldehyde	Sigma	USA
	Osmium tetroxide	Sigma	USA
Buffer - Washing	S. phosphate monobasic	Sigma	USA
	S. phosphate dibasic	Sigma	USA
Dehydration	Absolute alcohol	Merck	Germany
Substitution	Propylene oxide	BDH	England
Embedding	Epon 812 embedding kit	Polyscience	USA
Stain	Uranyl acetate	Merck	Germany
	Lead citrate	Fisher	USA

현미경은 Hitachi H-600형 (일본 Hitachi사 제품)을 각각 사용하였다.

2. 실험방법

1) 대조군과 실험군

표본제작시 고정 단계에서 침투 완료 단계(중합 전단계)까지 회전 교반기(rotator)를 사용하는 통상적인 방법으로 할 때 소요되는 시간은 1,640분이 소요 되는데 이를 대조군으로 하였다. 초음파 세척기를 이용한 실험 방법은 세 가지 방법을 사용하였는데 소요시간이 62.5분인 경우를 실험 I군, 소요시간이 125분인 경우를 실험 II군, 그리고 소요시간이 250분인 경우를 실험 III군으로 하였다(표 2).

2) 시료 처리방법

시료 처리는 각 장치에서 채취한 조직편들을 전고정액인 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer pH 7.4)가 포함된 아크릴판 위에서 1 mm³ 크기로 세절하여 동일 고정액이 들어 있는 내경이 넓은 시료병 (5 ml)에 넣어 4°C에서 전고정하였다. 이하 시료처리 과정은 통상적인 술식에 따라 인산완충 용액 (0.1 M phosphate buffer pH 7.4)에 세척하고 다시 1% OsO₄에 후고정하여 완충액으로 세척하였다.

탈수과정은 3차 증류수로 희석된 계열별 알코올로 탈수시키고 propylene oxide로 치환한 다음 epon 혼합물 (polybed 812 kit, Polyscience사 제품)로 그 비율은 A (Epon 812+DDSA) : B (Epon 812+MNA) 가 4 : 6 비율로 하여 침투 및 포매한 후 열중합과정을 거쳐 블록을 제작하였다.

중합 (polymerization)은 대조군은 37°C, 45°C 및 60°C에서 각각 12시간, 12시간 및 48시간을 실시하였고, 초음파 세척기를 이용한 실험 I, 실험 II, 실험 III군은 동일하게 80°C에서 20시간 실시하였다.

초음파 세척기 이용 조건은 수조 내부에 시료병 내 용액 높이와 같게 약 2 cm 정도의 물 높이를 유지하면서 수조내 물의 온도는 초음파 기계 계기판을 보면서 온도 상승시 일부 물을 제거하고 대신 얼음 조각을 넣어주는 방법으로 일정한 온도 (20°C)를 유지시켰다.

각 실험군별 시료처리 조건은 표 2와 같이 실시하였다.

3) 관찰 방법

각 실험군별 제작된 블록은 각각 실험군마다 3~5 개씩 무작위로 선정하여 초박절편기에 유리칼 (glass knife)을 장치하여 각 블록은 공통적으로 시료의 중간부분까지 박절한 다음 0.5 μ 두께로 준초박절편 (semithin section)을 만들어 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경 상에서 시료의 중심 부분 기준으로하여 관찰 부분을 제외한 나머지 부분은 제거한 다음 diamond knife를 이용하여 간접색이 silver-gold색으로 보이는 60~80 nm 두께로 초박절편을 만들어 grids에 부착하였다.

이중 전자염색은 대조군과 실험군 모두 같은 조건으로 2% uranyl acetate에 25분간 전도염색 시킨 다음 3차 증류수로 수세후 건조시키고 다시 1% lead citrate에 6분간 염색시켜 수세 및 건조하여 투과전자현미경 (Hitachi H-600)으로 가속전압 75 kV에서 관찰하였다.

Table 2. Experimental design

Exp. step		Groups			
		Control	UB I	UB II	UB III
Fixation	Pre. : 2.5% GA	240 mins	5 mins	10 mins	20 mins
	Post. : 1% OsO ₄	120 mins	10 mins	20 mins	40 mins
Washing	0.1 M PBS	40 mins	1.5 mins	1min×3	2 mins×3
Dehydration	50% ETOH	20 mins	1.5 mins	3 mins	6 mins
	70% ETOH	20 mins	1.5 mins	3 mins	6 mins
	80% ETOH	20 mins	1.5 mins	3 mins	6 mins
	90% ETOH	20 mins	1.5 mins	3 mins	6 mins
	100% ETOH	20 mins	2.5 mins	5 mins	10 mins
	100% ETOH	20 mins	2.5 mins	5 mins	10 mins
Substitution agent	Propylene oxide	20 mins×2	5 mins	5 mins×2	10 mins×2
Infiltration	PO : Epon mixed 1 : 1	180 mins	10 mins	20 mins	40 mins
	1 : 2	180 mins	10 mins	20 mins	40 mins
	only Epon mixed	720 mins	10 mins	20 mins	40 mins
Total time		1,640 mins	62.5 mins	125 mins	250 mins
Polymerization	37°C 12 hrs		80°C	80°C	80°C
	45°C 12 hrs		20 hrs	20 hrs	20 hrs
	60°C 48 hrs				

* UB I ; Ultrasonic bath method group I, UB II ; Ultrasonic bath method group II, UB III ; Ultrasonic bath method group III, ETOH ; Ethyl alcohol, GA ; Glutaraldehyde, mins ; minutes, hrs ; hours

결 과

1. 대조군

간 세포의 핵은 둥근 원형을 보이고 염색질은 핵막의 가장자리 주변에서 잘 관찰되었고 일부는 핵소체도 보이며, 핵막은 2중막으로 사이 사이 핵구멍들도 잘 관찰되었다.

세포질에는 구형 또는 난원형의 사립체들 내부에는 기질과 능선들도 잘 보존되어 있었다. 조면 내형 질세망(rough endoplasmic reticulum; 이하 RER)들은 잘 배열된 층상의 구조물을 하며 주변에는 소수의 활면 내형질세망(smooth endoplasmic reticulum; 이하 SER)들도 보이며 그밖에 소수의 용해소체, 과산화소체, 당원 과립이 잘 보존되어 있다. 간 세포들 사이 담모세관에는 일정 크기의 미세융모들이 내장을 차지하고 있고 이웃에는 세포간극도 잘 보존되어 있었다(Fig. 1).

신장은 사구체 중심으로 관찰된 미세구조적인 특징으로 기저막을 중심으로 좌우에 혈관내피세포들과

주세포 돌기들이 부착되어 있으며 주변에는 사구체 간질세포들도 소수 관찰되었다.

단면으로 관찰된 혈관 내피세포들은 대략 일정 크기의 혈관 내피구멍이 기저막과 연결되어 있고 반대편 쪽에는 일정한 틈을 형성하는 주세포 돌기들이 잘 관찰되었으며, 사구체 간질세포는 다소 불규칙한 핵을 가지며 세포질에는 골지체, 소포, 자유 리보솜 등 소수의 세포 소기관들이 잘 보존되어 있다.

위의 위벽을 구성하는 몇 종류 세포들 가운데 흡수세포와 분비세포들을 중심으로 관찰한 결과 흡수세포들에서는 일정 크기의 잘 발달된 미세융모들이 세포 표면에서 관찰되고, 세포질에는 구형 또는 난원형의 많은 사립체들이 보이며, 이들의 기질 및 능선들도 잘 보존되어 있었다. 분비세포들에서는 핵이 다소 불규칙한 난원형으로 세포의 기저부에 위치하고 있고 상부에는 많은 분비과립들이 일부는 융합을 보이기도 하며, 주변 가장자리에는 많은 조면 내형 질세망들도 함께 관찰되었다(Fig. 2).

심근의 미세구조는 잘 배열된 근원섬유들과 이들

사이에는 많은 사립체들이 일정한 크기로 잘 배열되어 있고 내부의 능선들도 잘 보존되어 있으며, 심근 세포의 경계부가 되는 윤반들도 밀착된 형태로 잘 보존되어 있었다(Fig. 3).

2. 실험 I 군

제작된 각 시료들은 절편 제작 과정에서 절편이 잘 부서지며 주름이 만들어지고 절편된 표본들에서는 작은 절편 구멍들이 형성되기도 하였고(Fig. 5), 전자선 조사시 표본의 흐름도 부분적으로 관찰되었다.

간세포는 대조군과 비교하여 핵이나 세포질에서 RER, SER, 당원과립, 과산화소체, 세포막 등은 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 반면 사립체는 일부 막이 팽창되기도 하여 큰 공포를 형성하기도 하며 부분적인 파괴도 관찰되었다(Fig. 4).

신장은 대조군과 비교하여 사구체내 혈관 내피세포들과 사구체 간질세포의 세포질은 세포소기관의 소실로 보이는 소견으로 뚜렷하지 못한 세포소기관들과 낮은 전자 밀도를 보이기도 하였다(Fig. 5).

위에서는 흡수세포들에서 사립체의 심한 손상을 보였고 분비세포들에서는 역시 사립체의 손상과 RER의 팽창도 함께 관찰되었다(Fig. 6).

심근에서는 근원섬유의 배열이나 윤반의 구조들이 대조군과 유사하나 사립체의 팽창과 파괴 및 능선의 소실이 보이며 사립체 사이 주변공간의 확장이 관찰되었다(Fig. 7).

3. 실험 II 군

제작된 각 표본들은 절편 제작 과정에서나 현미경 관찰시에 실험 I 군에서 기술된 여러 가지 인공산물들을 관찰할 수 없었다.

간세포는 대조군에서와 마찬가지로 핵에서는 핵막, 염색질, 핵소체 및 핵공은 잘 보존되어 있으며 세포질에서도 사립체, RER, SER, 미소체, 당원과립 등이 잘 보존되어 있으며 간 세포사이 담관세관 내강에는 잘 발달된 미세용모들과 주변에는 세포간격도 잘 관찰되었다(Fig. 8).

신장은 사구체 여과막을 이루는 주세포 돌기와 틈, 기저막 및 혈관 내피세포들은 일정한 형태를 잘 유지하고 있으며 사구체 간질세포들도 핵을 비롯한 세

포질내 사립체, 미세섬유 등이 잘 보존되어 있었다(Fig. 9).

위에서 분비세포들에는 핵과 세포질내 분비 과립들은 잘 경계지워져 있었으나 일부에서는 RER의 팽창이 소수 관찰되었고, 흡수세포에서 사립체들은 대조군과 유사하게 잘 보존되어 있으나, 일부 세포질에서는 작은 소포들이 관찰되었다(Fig. 10).

심근에서 근원섬유와 윤반의 배열은 잘 보존되어 있으며 이들 사이에 위치하는 사립체들은 일부 기질의 소실도 보이기도 하지만 전체적인 보존 정도는 대조군과 유사하였다(Fig. 11).

4. 실험 III 군

실험 III 군에서도 역시 실험 II 군과 마찬가지로 절편 제작 과정이나 현미경 관찰시에 실험 I 군에서 기술된 시료제작시 나타나는 여러 가지 인공산물들은 관찰할 수 없었다.

간세포는 대조군과 비교하여 핵에서는 핵막이나 핵소체는 유사하게 관찰되나 일부에서 염색질의 소실을 보이기도 하였다. 세포질에서는 사립체, RER, SER, 과산화소체 등 소기관들은 잘 보존되어 있으나 일부 세포 기질액의 소실로 보이는 낮은 전자밀도를 보이기도 하였다(Fig. 12).

신장의 사구체에서는 여과막 구조물들이 대체로 잘 보존되어 있으나 사구체 간질세포들에서는 간세포에서와 유사하게 일부 핵질과 세포질의 소실로 인해 낮은 전자 밀도로 관찰되었다(Fig. 13).

위에서는 분비세포나 흡수세포 모두에서 핵이나 세포질내 세포 소기관의 보존 정도는 대체로 양호하게 관찰되었다.

심근 세포에서는 근원 미세섬유들 사이에 분리가 일부 관찰되며, 사립체들은 대조군에 비해 약간의 종창도 관찰되었으나 윤반은 잘 보존되어 있었다(Fig. 14).

고 찰

본 연구는 초음파를 이용한 생물시료의 전자현미경적 관찰을 위한 시료 처리 효과를 확인하여 보고자 표본 제작이 다소 어렵다고 알려진 장기들 가운데 간

을 비롯하여 관상 구조인 신장, 주로 흡수와 분비세포들로 구성된 위 상피조직, 그리고 근육 조직이면서 많은 사립체를 갖고 있는 심근을 실험재료로 선정하여 표본제작에 초음파의 유용성을 확인코자 하였다.

전자 현미경과 광학 현미경적 관찰을 위한 시료 제작 과정은 대부분 유사하나 일부 차이점을 살펴보면, 투과 전자현미경적 관찰을 위한 시료제작의 경우 절편의 두께는 광학현미경적 관찰을 위한 시료제작에 비해 약 1/50~1/100 정도의 얇은 절편이 필요하며, 광원(light source)은 투과력이 가시광선에 비해 약한 전자선을 이용하여 초미세구조를 관찰하게 된다. 이때 표본은 고진공 상태에서 얇은 절편 상태로 강한 전자선이 투과되는 까다로운 조건에 놓이게 된다. 일반적으로 조직은 시료 채취와 함께 자가용해가 일어나기 시작하며 표본 제작 과정에서 가장 중요한 첫단계가 되는 고정 단계에서는 조직의 자가용해를 방지하고 세포내 생화학적 물질의 보존이, 가능한 한 살아있는 상태에 가깝게 구조를 보존하는 것이 최우선이다(Millong, 1976).

고정에는 물리적 고정과 화학적 고정이 있으며, 화학적 고정은 화학 약제가 조직내 침투로 세포내 단백질 분자들의 구조적인 변화를 유발하는데 특히 glutaraldehyde는 조직내 단백질인 lysin의 α -amino기 사이에 교차결합(cross-linking) 함으로서 단백질 변성을 통한 고정효과를 나타내는 것이다(Chew *et al.*, 1983; Leong and Gilham, 1989; Bozzola and Russell, 1992; Webber *et al.*, 1980).

Glutaraldehyde는 조직내 침투 속도가 침지고정시 시간당 1mm 정도로 경화된 조직이나 큰 조직들을 고정하게 되면 고정이 완료되기까지 시간이 걸리므로 약간의 조직 변화도 예상된다(Buenett, 1990).

고정액의 침투는 조직의 성질에 따라 다소 차이는 있으나 고정시 조직의 두께는 각 조직의 장기와 종(species)에 따라서도 차이가 있으며, 일반적으로 실험적 또는 병리조직학적 분야에서는 대략 1mm³의 크기로 하고 있다. 고정액의 양도 조직 부피의 5~10배 정도로 하며, 고정 과정에서 조직이나 세포의 변화를 최대한 방지하고자 완충 고정액, 적정온도, microwave, 초음파 및 탄닌산 같은 첨가물 등 여러 가지 조건들을 가하여 조직 깊숙히 효과적이고 신속

한 고정이 이루어지도록 하고 있다(Ian *et al.*, 1991; Palade, 1952; Hayat, 1990; Login and Dvorak, 1994).

고정시간은 시료의 성질에 따라 다르지만 너무 오래동안 고정을 하게 되면 핵 염색질의 응집, 당원과 립의 소실, 세포내 효소활성 소실이 있게 되며 불필요한 조작이나 잘못된 고정액의 선택은 인공산물을 만들 수도 있다(Crang and Klomprens, 1988).

본 실험에서 전고정제로 사용된 glutaraldehyde는 실험 시작하기 전에 인산 완충용액으로 2.5%로 희석 사용하였으며, 온도 조건은 대조군은 4°C 이하에서, 그리고 실험군은 실온상태에서 처리하였다. 똑같은 신선한 고정액을 사용한 본 실험에서는 냉장과 실온, 즉 온도 차이로 인한 대조군과 실험군간의 차이는 구별할 수 없었다.

OsO₄가 조직의 고정 목적으로 사용되었을 때 초기에는 1차 단독고정제로 사용되었으나(Claude, 1948) 그 후 Sabatini 등(1963)이 glutaraldehyde와 OsO₄의 이중 고정법을 소개한 이후 많은 변형된 방법들이(Karnovsky, 1965) 소개되고 있다.

현재 후고정제로 많이 사용되는 OsO₄의 기능은 조직의 고정 효과뿐만 아니라 contrast를 증가시켜 염색성을 증가시키며, 지질 보존 효과가 우수한 것으로 알려져 있으나, 작업 과정 중 액체나 증기에 노출 시 피부나 호흡기 등에 매우 해로운 물질로 알려져 있다(Russell and Burguet, 1978; Muller and Jacks, 1975).

또한 OsO₄는 조직내 침투 속도가 시간 당 0.5mm 정도로 실온에 비해 저온(4°C)에서 더욱 느리기 때문에 시료의 크기를 작게 만드는 이유가 되기도한다.

조직의 크기를 1mm³로 하여 glutaraldehyde와 OsO₄를 전 후 고정액으로 하여 주어진 조건에서 처리해 본 결과 대조군, 실험 II군 및 실험 III군에서는 각 조직의 미세구조 보존 정도가 양호하였으나 실험 I군에서는 불충분한 고정에서 볼 수 있는 일부 세포소기관의 변성들이 관찰되어 전체적으로 고정 처리시간이 짧은 실험 I군에서는 충분한 고정이 이루어지지 않아 미세구조의 보존 정도가 불량하였음을 확인할 수 있었다.

시료 제작 과정에서 2단계라 할 수 있는 세척과

탈수는 충분하면서 빠른 시간에 이루어지는 것이 효과적이다.

세척은 대부분 고정제에 사용된 완충액을 주로 사용하는데, 불충분한 세척은 조직내에 남아 있는 미반응 glutaraldehyde가 OsO_4 와 반응하여 산화물을 형성하여 세포내 여러 소기관들에 침착되어 인공산물의 형성 원인이 되며, 판독의 오류를 범할 수 있는 원인이 되기도 한다. 그래서 세척은 최소한 1~3시간동안 3~4회 정도로 완충액을 교환하면서 충분한 세척이 필요하며, 이 경우 정지 상태보다는 흔들어 줌으로서 세척 효과를 높일 수 있다고 한다(Bozzola and Russell, 1992).

본 실험에서는 조직에 진동 효과를 주는 초음파 세척기가 이용된 실험군 모두에서 짧은 처리 시간에도 불구하고 대조군과 유사한 세척 효과를 확인할 수 있었다.

탈수 과정은 알코올이나 아세톤을 흔히 사용하며, 아세톤을 사용하면 치환과정이 불필요하며 곧 바로 조직내 수지의 침투과정이 이루어지게 되나 흡습성이 강하여 불완전한 탈수의 원인이 될 수 있다. 알코올을 사용한 탈수 과정은 저농도에서 시작하여 점차 농도를 높여 고농도에서 완전한 탈수가 이루어지도록 함으로서 수지의 침투성을 도모하고, 조직의 변화를 최소화할 필요가 있다. 만약 처음부터 고농도로 사용할 경우 조직의 수축을 초래할 수 있으며, 탈수 시간 부족으로 조직내 수지의 침투가 어렵게 되고 결국 불완전한 증합으로 박절시 좋은 절편을 얻기가 어렵게 된다. 또한 탈수를 필요이상 장시간 할 경우 가용성 성분인 불포화 지방산 등 조직 내용물의 유출을 일으킬 수 있다. 따라서 저농도에서 시작하여 적정 최단 시간내에 탈수 과정을 마치는 것이 세포 미세구조 보존 차원에서 무엇보다 중요하다(Muller and Jacks, 1975).

본 실험에서 실험 III 군에서 관찰된 소견으로 미루어 보아 시료 처리시간이 길어지면 일부 세포 기질의 유출로 보이는 소견이 관찰됨으로서 장시간의 초음파 처리는 오히려 미세구조 보존 측면에서 좋지 못한 영향을 미칠 수 있다고 사료된다.

시료가 부서지지 않고 균일한 두께의 절편을 얻으려면 탈수과정에 이어 치환, 침투 및 포매가 잘 이루어

어져야 하며, 치환제는 탈수제와 포매제 모두에 친화성을 가진 물질이 이상적인데 현재 propylene oxide 와 butyl glycidyl ether 등을 사용하고 있다.

포매제는 절편제작시 박절이 쉽고, 전자선에 잘 견디며, 조직의 3차원적 구조를 변화시키지 않는 성질을 가진 것이 이상적인데 실험 방법과 조건에 따라 다소 다르지만 비수용성 수지나 수용성 수지가 사용되고 있다. 이중 의학 및 생물 시료 제작에 가장 많이 사용되고 있는 것으로는 비수용성 수지인 epoxy 계 수지가 널리 사용되고 있다(Spurr, 1969).

Epoxy 수지는 미국 Shell oil 사에서 "Epon"이라는 상품명으로 처음 만들어져 포매제로 소개되었다(Luft, 1961). Epoxy 수지의 성질은 중축합물로 점도가 있어 조직내 침투가 빠른 시간내에 이루어지지 않지만, 수지 경화물은 빛에 대한 굴절률이 유리와의 거의 같으며 세포 및 조직의 형태 보존이 우수하고, 광학현미경적 관찰을 위한 염색이 가능하다.

전자현미경적 관찰에 필요한 시료 제작시 고정, 수세, 탈수, 치환, 침투 및 포매 단계에 이르는 어느 단계에서 소홀한 처리가 이루어지면 현미경 관찰시 여러 가지 문제점이 발생할 수 있다. 즉 불충분한 고정에 따른 자가용해의 결과로 세포소기관의 변형을 초래하고, 불충분한 탈수, 포매 및 잘못된 선택된 포매제에 의한 경우 박절시 수지가 연하여 chatter 및 주름이 형성되기 쉽고, 전자 염색시 염색성의 불균등이나 오염물질의 제거가 잘 이루어지지 않으며, 전자선 조사시 조직의 수축 및 이완이 일어나고, 조직의 구멍과 절편이 찢어지는 경우가 발생하게 된다.

본 실험에서 실험 I 군에서 관찰된 절편의 구멍, 관찰시 전자선에 의해 절편이 찢어지는 현상 및 일부 세포소기관의 변형 등은 시료제작 과정에 소요되는 시간의 무리한 단축에 의한 결과로 사료되며, 따라서 시료제작에 무리한 시간 단축이나 부주의한 처리는 결국 전자 현미경 관찰에 나쁜 결과를 초래할 수 있으므로 항상 주의를 요하는 세심한 처리가 요구된다.

결 론

투과 전자현미경을 신장질환이나 종양 감별 등 진

단의 목적으로 이용할 경우 통상적인 방법으로 만들어지는 시료제작에는 많은 시간이 소요되는 단점이 있다. 그래서 시료 제작과정에 초음파를 이용하여 각 시료 제작 단계에서 용매나 용질의 신속한 조직 내 침투를 유도함으로써 시료 제작에 소요되는 시간을 단축한 후 인공산물의 형성이나 조직 보존성에 어떤 영향을 미치는가를 알아보려고 본 실험을 실시하였다.

흰쥐를 실험 동물로 하여 간, 신장, 위 및 심장 조직을 대상으로 하여 고정 단계에서 침투 단계까지 회전 교반기를 이용한 통상적인 방법을 대조군으로 하고, 초음파 세척기를 이용한 소요시간 62.5분을 실험 I군, 125분을 실험 II군, 그리고 250분을 실험 III군으로 나누어 실험한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 대조군에서 제작된 블록은 절편이 양호하고 염색성도 좋았으며 각 조직들의 세포 미세구조들도 잘 보존되어 있었다.

2. 실험 I군에서는 탈수 및 수지의 침투 부족으로 절편 제작이 다소 어려웠으며, 절편 표면에는 크고 작은 다수의 절편 구멍이 보였다. 또한 고정 불충분으로 일부 조직에서는 사립체의 종창과같은 세포소기관의 변성도 관찰되었다.

3. 실험 II군에서는 대조군과 유사하게 블록 절편이 양호하였고 염색성도 좋았으며 각 조직들의 세포 미세구조들도 잘 보존되어 있었다.

4. 실험 III군에서는 탈수나 수지의 침투 부족으로 인한 절편의 찢어지는 현상들은 발견할 수 없었으나, 일부 조직에서는 세포 기질의 유출로 보이는 전자 밀도가 낮게 관찰되는 세포들이 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면 초음파 세척기를 이용한 전자현미경적 관찰을 위한 표본제작시 고정에서 침투 완료단계에 이르기 까지 소요시간은 대략 2시간 정도가 가장 좋게 나타났으며 이보다 단시간 또는 장시간 이용하게 되면 오히려 전자현미경적 관찰에 만족스럽지 못한 결과를 초래할 수 있다고 본다. 그래서 향후 빠른 진단 결과를 요하는 환자의 시료에 대해서 본 실험의 결과를 토대로 2시간 시료 처리법을 널리 이용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Baic D, Baic A, 1984. A fast method for processing biopsy material for electron microscopy, *Ultrastruct. Pathol.* 6, 347-349
- Bencosme SA, Tsutsumi V, 1970. A fast method for processing biological material for electron microscopy, *Lab. Invest.* 23, 447-451
- Bozzola JJ, Russell LD, 1992. *Electron microscopy. Principles and techniques for biologists*, Jones and Bartlett Publishers, Boston, pp.16-38
- Buenett MG, 1990. The mechanism of the formaldehyde clock reaction, *Chem. Edu.* 59, 160-162
- Chew EC, Riches DJ, Lam TK, Chan HJ, 1983. A fine structural study of microwave fixation of tissue, *Cell Biol. Int. Rep.* 7, 135-139
- Claude A, 1988. *Studies on cells : morphology, chemical constitution and distribution of biochemical functions*, Harvey Lecture 43, 1921-1964
- Crang RFE, Klomprens KL, 1988. *Artifacts in biological electron microscopy*, Plenum Press, New York, pp.16-54
- Giberson RT, Demaree RS, 1996. Microwave fixation : Understanding the variables to achieve rapid reproducible results, *Micros. Res. Tech.* 32, 246-254
- Glauert AM, 1978. *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*, North Holland Pub. Co., Amsterdam, pp. 24-75
- Hafiz S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden BI, 1985. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining, *J. Clin. Pathol.* 38, 1073-1075
- Hayat MA, 1990. *Fixation for electron microscopy*, Academic Press, New York, pp.10-75
- Ian AR, Blair FC, Carmencita LJ, 1991. Rapid ultrasonic bath processing for electron microscopy, *Ultrastruct. Pathol.* 15, 83-86
- Johannessen JV, 1973. Rapid processing of kidney biopsies for electron microscopy, *Kidney International* 3, 46-52
- Karnovsky MJ, 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy, *J. Cell Biol.* 27, 137A

- Leong ASY, Gilham P, 1989. A new, rapid microwave-stimulated method of staining melanocytic lesions, *Stain Tech.* 64, 81-85
- Login GR, Dvorak AM, 1994. Methods of microwave fixation for microscopy, *Prog. Histochem. Cytochem.* 27, 72-94
- Luft JH, 1961. Improvements in epoxy embedding materials, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409-414
- Millong G, 1976. Laboratory manual of biological electron microscopy, Mario Saviolo Editore, Vercelli, pp.12-98
- Muller LL, Jacks TJ, 1975. Rapid chemical dehydration of samples for electron microscopic examinations, *J. Histochem. Cytochem.* 23, 107-110
- Nesland JM, Millonig G, Wilson A, Johannesen JV, 1982. Rapid techniques in electron microscopy, *Ultrastruct. Pathol.* 3, 295-300
- Palade GE, 1952. A study of fixation for electron microscopy, *J. Exptl. Med.* 95, 285-298
- Russell LD, Burguet S, 1978. Ultrastructure of Leydig cells was revealed by secondary tissue treatment with a ferrocyanide: osmium mixture, *Tissue and Cell* 9, 99-112
- Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ, 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation, *J. Cell. Biol.* 17, 19-58
- Spurr AR, 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-40
- Webber MM, Barnes FS, Seltzer LA, Bouldin TR, Prasad KN, 1980. Short microwave pulses cause ultrastructural membrane damage in neuroblastoma cells, *J. Ultrastr. Res.* 71, 321-330

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** An electron micrograph of hepatocyte, the control group. Bile canaliculi (BI) with microvilli, numerous mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum (RER), smooth endoplasmic reticulum (SER), glycogen particles (G), lysosome (Ly) and peroxisome (P) are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar=1 μ m.
- Fig. 2.** An electron micrograph of absorbed and secretory cells of the stomach, the control group. Mitochondria (M), secretory granules (Gr) and rough endoplasmic reticulum in the cytoplasm are well preserved. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar=1 μ m.
- Fig. 3.** An electron micrograph of cardiac muscle, the control group. Myofilament (MF), mitochondria (M) and intercalated disc (arrow) are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar=1 μ m.
- Fig. 4.** An electron micrograph of hepatocyte, the ultrasonic bath treated group, 62.5 mins. In the cytoplasm, mitochondrial (M) swelling are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar=1 μ m.
- Fig. 5.** An electron micrograph of renal glomerulus, the ultrasonic bath treated group, 62.5 mins. The artifact holes (*) in the tissue are seen. Epithelial pore (arrows), basement membrane (BM) and pedicles are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 14,600$. Bar=1 μ m.
- Fig. 6.** An electron micrograph of absorbed and secretory cells of the stomach, the ultrasonic bath treated group, 62.5 mins. In the cytoplasm, mitochondrial (M) swelling are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar=1 μ m.

- Fig. 7.** An electron micrograph of cardiac muscle, the ultrasonic bath treated group, 62.5 mins. In the sarcoplasm, mitochondrial (M) swelling are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar= $1\mu\text{m}$
- Fig. 8.** An electron micrograph of hepatocyte, the ultrasonic bath treated group, 125 mins. In the cytoplasm, numerous mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum, smooth endoplasmic reticulum, glycogen particles, and peroxisome (P) are well preserved. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 9.** An electron micrograph of renal glomerulus, the ultrasonic bath treated group, 125 mins. The artifact, holes in the tissue are not observed. Also cytoplasm (CP) of phodocyte and glomerulus basement membrane (arrow) are well preserved. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 14,600$. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 10.** An electron micrograph of absorbed and secretory cells of the stomach, the ultrasonic bath treated group, 125 mins. Mitochondria, secretory granules (Gr) and rough endoplasmic reticulum in the cytoplasm are well preserved. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 11.** An electron micrograph of cardiac muscle, the ultrasonic bath treated group, 125 mins. Myofilament (MF), mitochondria (M) and intercalated disc (arrow) are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 12.** An electron micrograph of hepatocyte, the ultrasonic bath treated group, 250 mins. Electron lucent matrix of cytoplasm due to long preparation time. Mitochondria (M), Lysosome (LY), Peroxisome (P). Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 13.** An electron micrograph of renal glomerulus, the ultrasonic bath treated group, 250 mins. The artifacts holes in the tissue are not observed. Also cytoplasm (CP) and nucleus (N) matrix are electron lucent. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 14,600$. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 14.** An electron micrograph of cardiac muscle, the ultrasonic bath treated group, 250 mins. Myofilament (MF), mitochondria (M) and intercalated disc (arrow) are observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$. Bar= $1\mu\text{m}$.







