

제3장. 영구표본 제작과정 요약



제1절. 영구표본 제작과정 요약

재료 선정 -- 고정(fixation) 및 탈기(aspiration) --
수세(washing) 및 탈수(dehydration) -- 투명화
(clearing) -- 파라핀 침투(infiltration) 및 포매
(embedding) - 파라핀 블록 제작(Casting Paraffin
Blocks) -- 절단(section) -- 염색(staining) -- 신전
(flattening) -- 봉합 (Mounting) -- 관찰 및 현미경
사진 촬영



1. Collection of plant materials (식물재료 선정)

Use fresh normal material

2. Fixation and Aspiration (고정과 탈기)

1) Prepare of fixatives: F.A.A. (formalin-acetic acid-alcohol)

| | |
|-----------------------------|-------|
| Formalin (37-40%) ----- | 10 cc |
| Acetic acid (glacial) ----- | 5 cc |
| Ethyl alcohol (95%) ----- | 50 cc |
| Distilled water ----- | 35 cc |

2) Aspiration ; Air remove by use of the aspirator or vacuum pump



고정액의 조건

- (1) 조직 속에 속히 침투해서 즉시 세포의 기능을 정지시킬 것
- (2) 세포, 조직내용물의 형상, 위치가 가능한 한 변형되지 말 것
- (3) 식물재료를 경화시키지 않을 것
- (4) 응용력이 넓을 것
- (5) 사용이 용이하고 값이 싸 것
- (6) 염색에 지장을 주지 않을 것



고정액의 종류

(1) FAA (Formalin–Acetic Acid–Alcohol)

Sass(1958), One of the most useful plant fixatives

(2) Nawaschin's Fluid ; Mold, Microorganism fixation

(3) Bouin's Fluid ; Root tip, Embryo sac fixation

(4) Farmer's Fluid ; Cytological (chromosomal) studies

(5) Carnoy's Fluid ; "

(6) Zirkle's Fluid ; Mitochondria, allied structure fixation

(7) Glutaraldehyde–Osmium ; Most popular fixative for
electron microscopy



3. Dehydration(탈수)

탈수제; Alcohol, Butyl alcohol, Tertiary butyl alcohol

Fixatives -- 50% Alc. -- 60% -- 70% -- 80% --
- 90% -- 100% I -- 100% II



4. Transfer to a Solvent of Paraffin (파라핀 용매로 전이)

파라핀 용매; Xylene, Chloroform, Benzene, Toluene

(1) Ethly Alcohol : Xylene = 75% : 25%

(2) Ethly Alcohol : Xylene = 50% : 50%

(3) Ethly Alcohol : Xylene = 25% : 75%

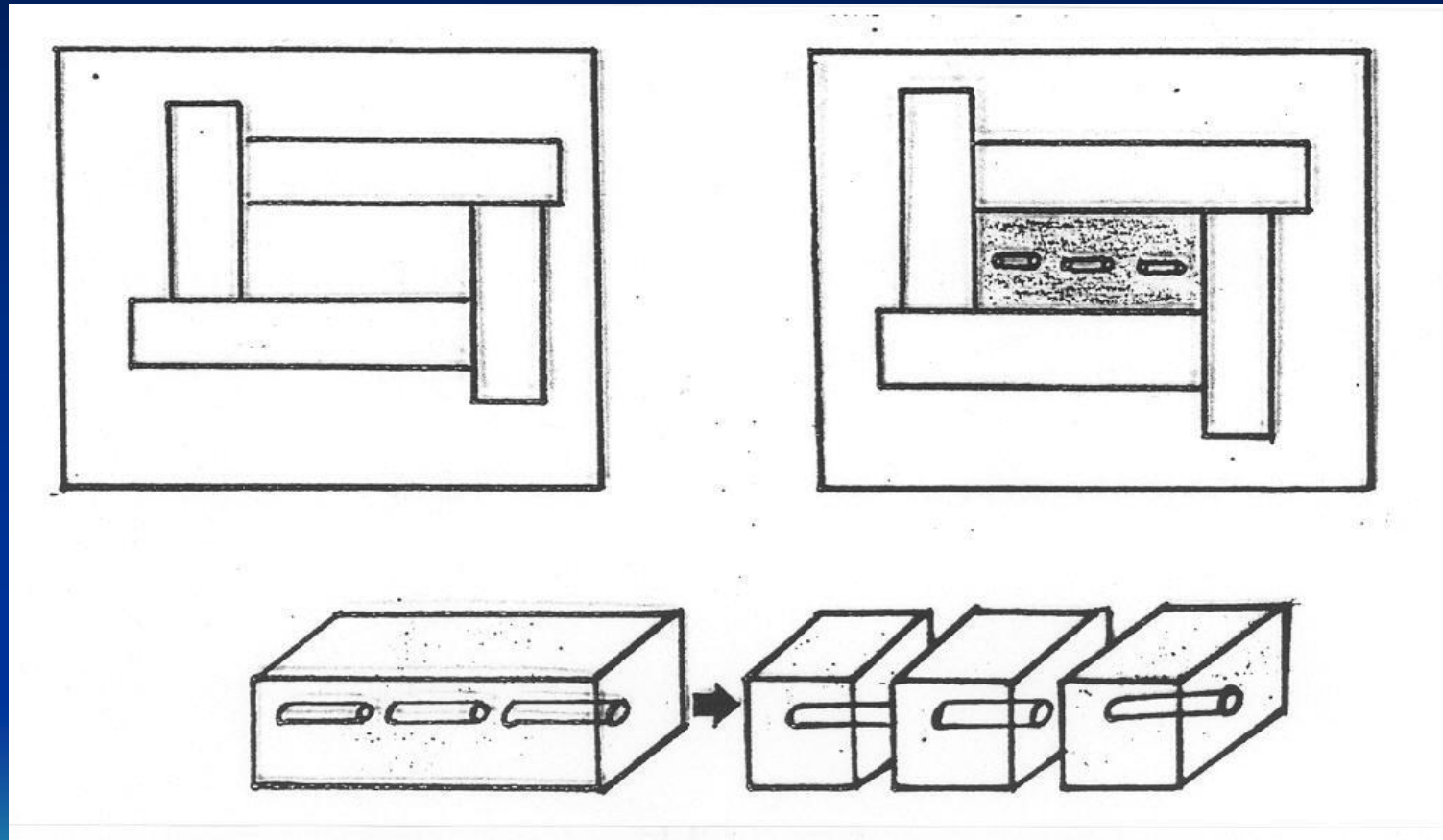
(4) Ethly Alcohol : Xylene = 0% : 100%

5. Infiltration (침투) and Embedding (매몰)

- (1) Prepare cold xylene and put into vials
- (2) Pour a teaspoonful of melted paraffin over the cold xylene and place the vials in 35°C incubator
- (3) Add more paraffin until saturation
- (4) After saturation, translocate the vials into 60°C
- (5) At intervals of 1–2 days, pour off one–fourth of the paraffin–xylene solution into the waste can and add same volume of new paraffine



6. Casting Paraffine Blocks(파라핀 블록 제작)



7. Slide Preparation (슬라이드 준비)

(1) Perfectly clean slides

slide glass는 cleaning solution 에 몇 일간 처리한 후 수세하여 95% 알코올에 담가 두었다가 사용할때 마다 깨끗한 기제로 닦아서 사용한다.

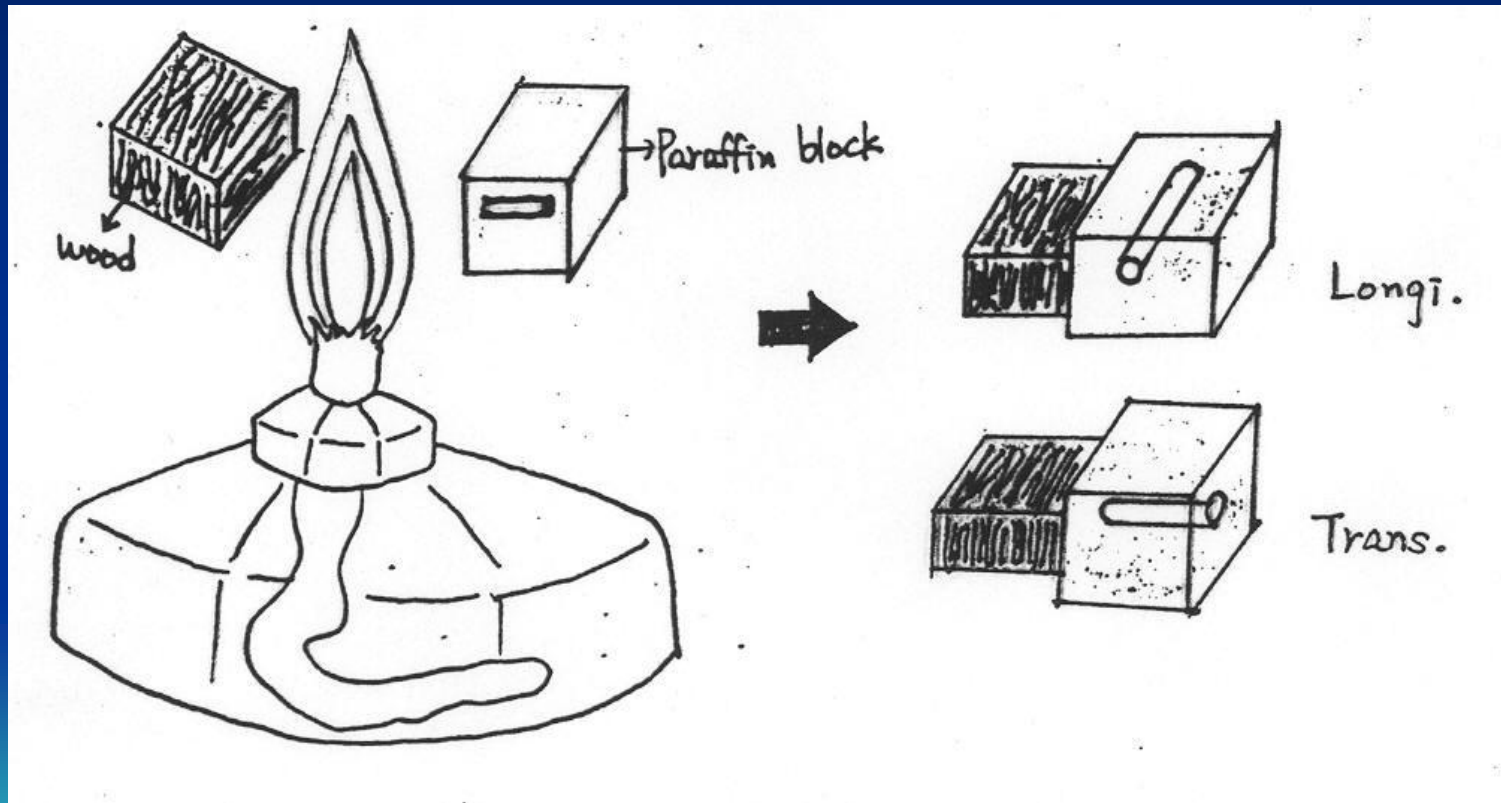
(2) Coating adhesive agent (egg albumin)

(1)에서 준비한 깨끗한 slide glass를 놓고 그 위에 희석된 알부민(albumin)용액을 한 방울 떨어뜨린 다음 깨끗한 검지 손가락으로 넓게 골고루 펴서 문지른다.

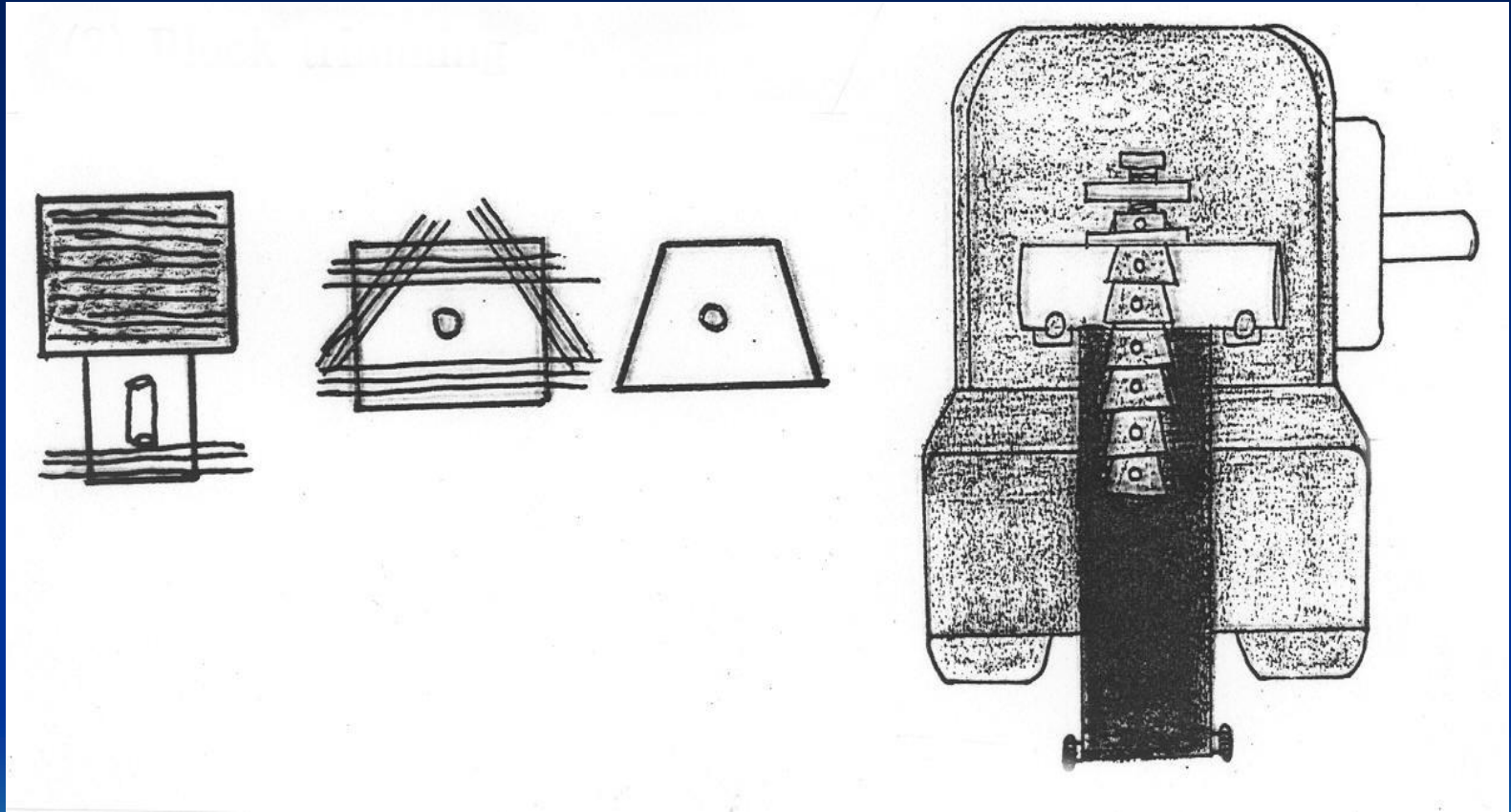


8. Section(절단)

(1) Mounting of tissues on object blocks



(2) Block trimming



(3) Section by rotary microtome

rotary microtome을 이용하여 paraffin으로 포화시킨 material을 ribbon 상태로 절단시켜야 한다. 이때 중요한 것은 angle이다. angle이 설정되지 않은 경우 20° 부터 시작하여 좌우로 전환시킨다. 절단 두께는 $8 \sim 10 \mu\text{m}$ 가 적당하다.



(4) Flattening by slide warmer

microtome에 의해 만들어진 절편은 약간 말리게 된다. 신전은 절편을 원래의 상태로 펴는 과정으로 그 순서는 다음과 같다.

- 1) 슬라이드 보온기 (slide warmer)의 온도는 파라핀의 용점보다 $5\sim 6^{\circ}\text{C}$ 정도 낮아야 한다. (왜냐하면, 용점보다 높거나 같으면 조직 내에 침투되어 있는 파라핀이 녹기 때문이다.)



2) 붓에 물을 묻혀 cover glass 크기로 자른 파라핀 절편을 알부민 용액이 발라져 있는 slide glass 위에 놓고 구겨진 곳이 없도록 needle을 사용하여 펴 준다. (이때 조직을 건드리지 않고 조직 주위의 파라핀을 needle로 잡도록 한다.

3) 슬라이드 보온기 위에 slide glass를 놓고 파라핀 절편이 잘 펴지도록 한다.

4) 알부민 용액이 건조되면 37°C에서 24시간 건조하거나 실온에서 2~3일간 둔다.



Microtome의 종류

Microtome은 paraffin cake 속에 든 재료를 일정한 두께로 절단하는 기계이다.

- 1) Sliding microtome : knife가 움직여서 재료를 절단하는 방식. 절단속도가 느리며 knife가 길다.
- 2) Rotary microtome : Knife는 고정되고 재료가 움직여서 절단하는 방식. 절단속도가 빠르며 연속절단(paraffin ribbon)을 얻을 수 있다.

3) Freezing microtome : 특수용도

4) Ultramicrotome : 전자현미경용

5) Vibratome : 생체절단($20\ \mu\text{m} \sim$) : 포매과정
이 필요하지 않고 $10\ \mu\text{m}$ 간격으로 절단이 가능
하다.

6) cryotome(동결박편기) : 시료를 동결시켜 단
단하게 만든 뒤 절단. 온도 -35°C 포매과정을
거치지 않고 얇은 박편 제작가능. 동식물 생체
조직 박편제작



9. Staining Paraffin

Xylene I (5 min) -- Xylene II (5 min) -- 100% Alc. (2-5 min) -- 95% Alc. (2-5 min) -- 70% Alc (2-5 min) -- 50% Alc. (2-5 min) -- 30% Alc. (2-5 min) -- D. W. (1-2 min) -- Aqueous Safranin (1-12 hr)-- Washing -- 30% Alc. (2-5 min) -- 50% Alc. (5-10 min) -- 70% Alc. (5-10 min) -- 95% Alc. (5-10 min) -- Fast Green in 95% Alc. (5-30 sec) -- 100% Alc. I (5-10 min) -- 100% Alc. II (5-10 min) -- Carbol-Xylene (phenol:xylene = 1:3) (5-10 min)-- Xylene I (5 min) -- Xylene II (5 min)-- Xylene III (5 min)

<toluidine blue 염색법>

William S. Sakai (Stain Technology, 48:247–249, 1973)

1. The slides are placed in 0.05% toluidine blue O in D.W. for 20–30 min.
 2. Rinsed in water for 1 min and allowed to air dry
 3. The paraffin is removed with 2 changes of xylene and the coverslip is mounted
- > Lignified tissue, suberized tissue and some tannins are stained blue–green, while nonlignified walls are stained red–purple. Starch is unstained, cytoplasm and RNA are purple, and DNA is blue or blue–green.

10. Mounting

가장 일반적인 mounting agent에는 canada balsam 인데 그 조성은 balsam : xylene = 1 : 1

Canada balsam 1방울을 염색 절편위에 떨어뜨리고 cover glass를 덮는데 기포가 들어가지 않도록 45도 각도로 서서히 덮어야 하며 만약 기포가 생겼으면 cover glass를 가만히 눌러서 기포를 제거한다. Canada balsam은 xylene에 녹여서 액체상태로 만들어 사용한다. 완전히 만들어진 슬라이드는 slide box에 넣어 보관한다.