

제10장. 절편제작 (Sectioning)



제1절. 슬라이스 글래스 준비

(1) Perfectly clean slides

slide glass를 깨끗하게 닦아서 말린다

(2) Coating adhesive agent (egg albumin, gelatin)

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



(1) Perfectly clean glass slides

(2) Coating with adhesive agent (egg albumin)



제2절. 절편제작 (Sectioning)

(1) Mounting of tissues on object blocks ;

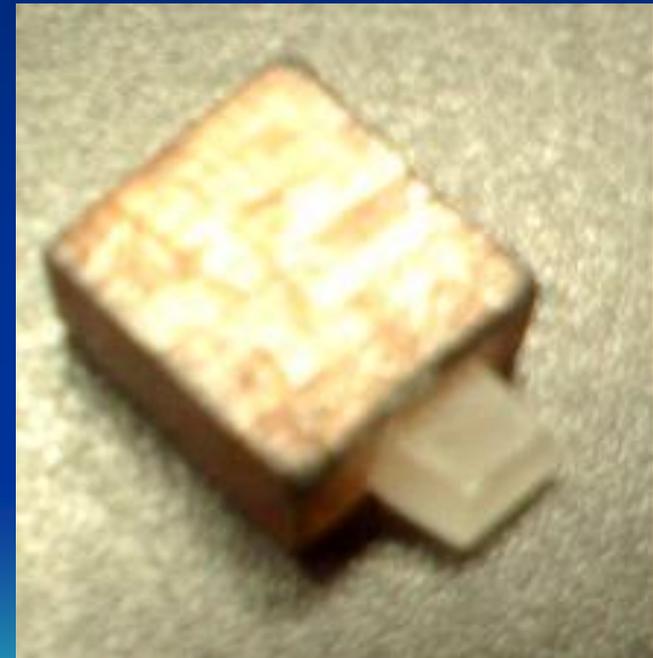
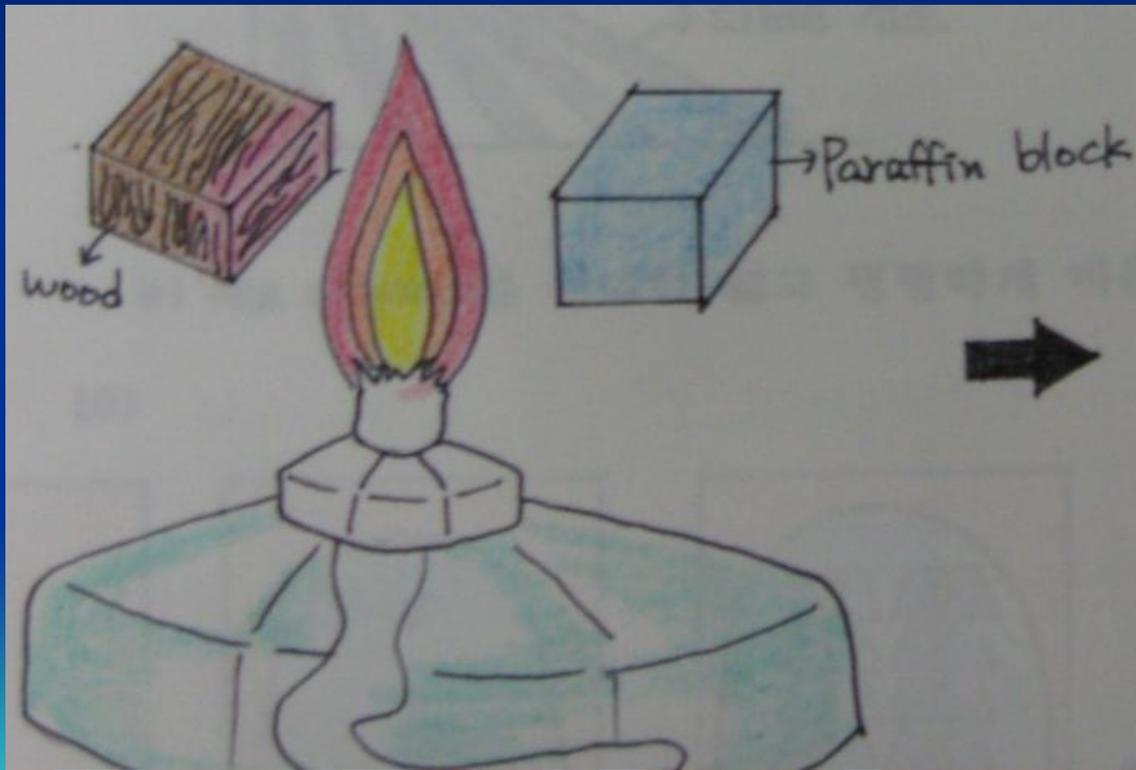
Cake의 재료부위를 적당하게 잘라서 재료에 알맞게 knife로 깨끗하게 (반듯하게) 다듬는다. 그 다음에 sparular를 alcohol lamp를 이용하여 조금 달구어서 나무로 된 절편 (block)에 붙인다.

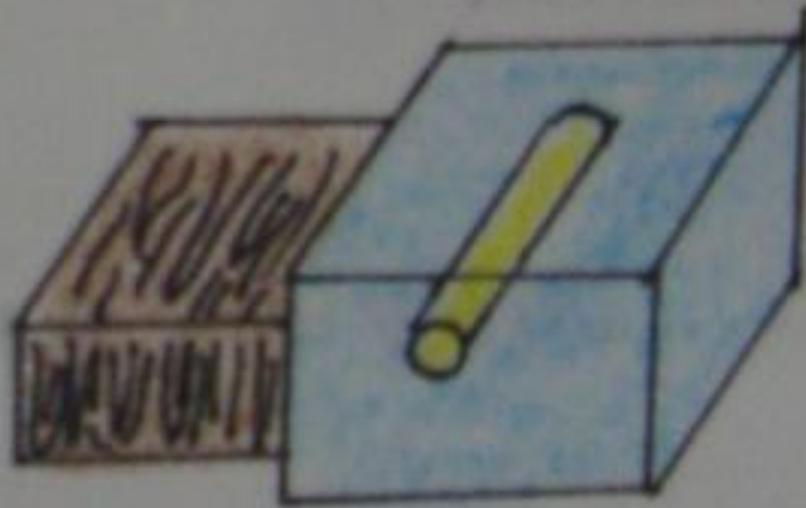
(2) Block trimming ; 재료의 윗면과 아래면이 평형이 되도록 사다리꼴이 되돌고 면도날을 이용하여 잘 다듬는다.

(3) Section by rotary microtome ; rotary microtome을 이용하여 paraffin으로 포화시킨 material을 ribbon 상태로 절단 시켜야 한다. 절단 두께는 8 ~ 10 μm 가 적당하다.

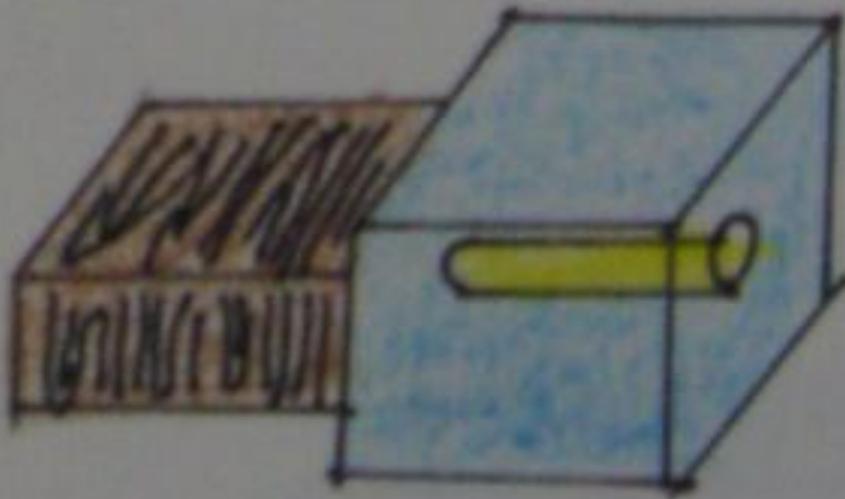


- (1) Mounting tissues on wooden blocks
- (2) Block trimming
- (3) Section with rotary microtome ; 8–10 μm
- (4) Flattening on slide warmer





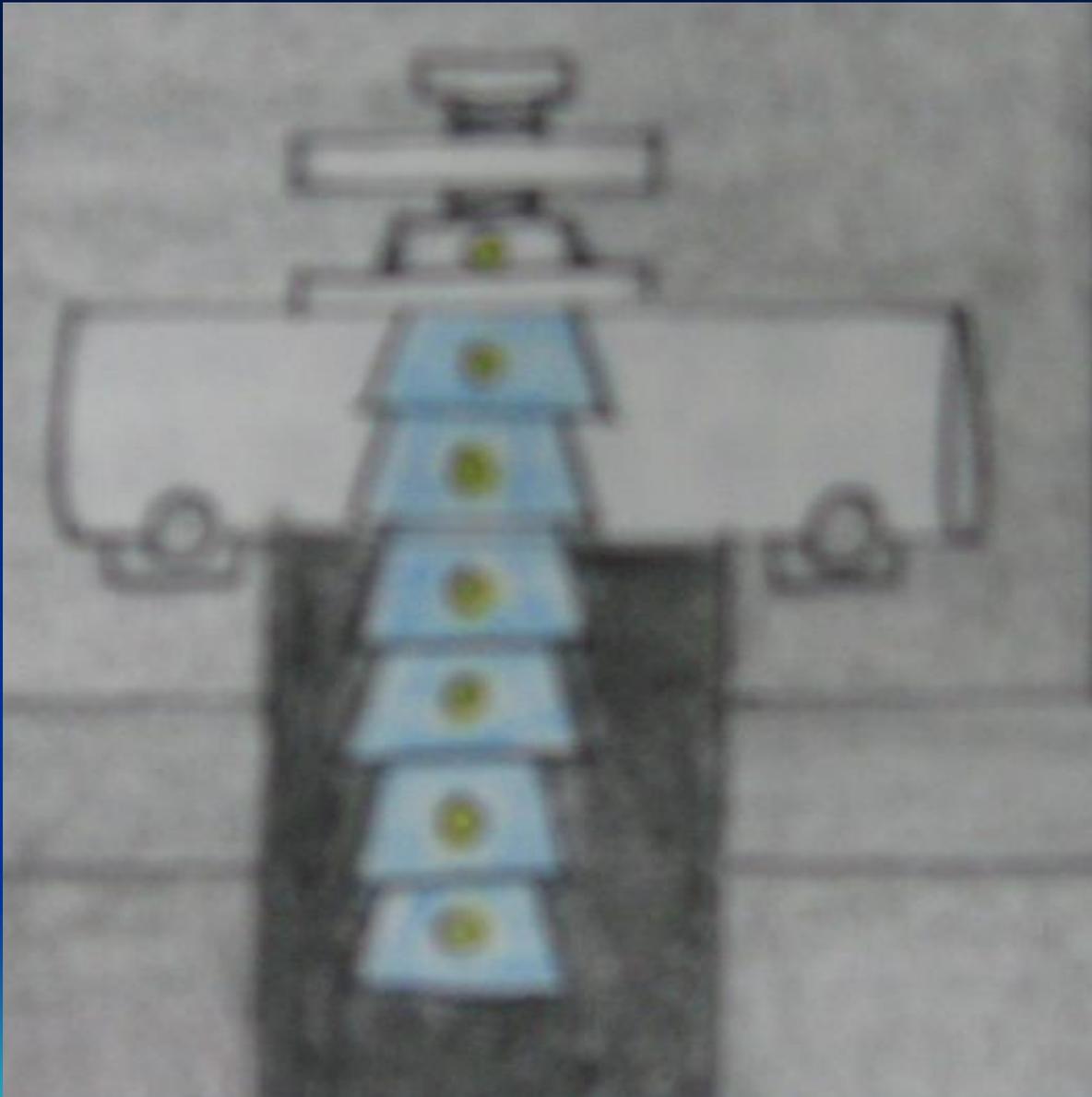
Longi



Trans.









과학신문

신씨의 눈

이제다 52 황금 기사와 사제

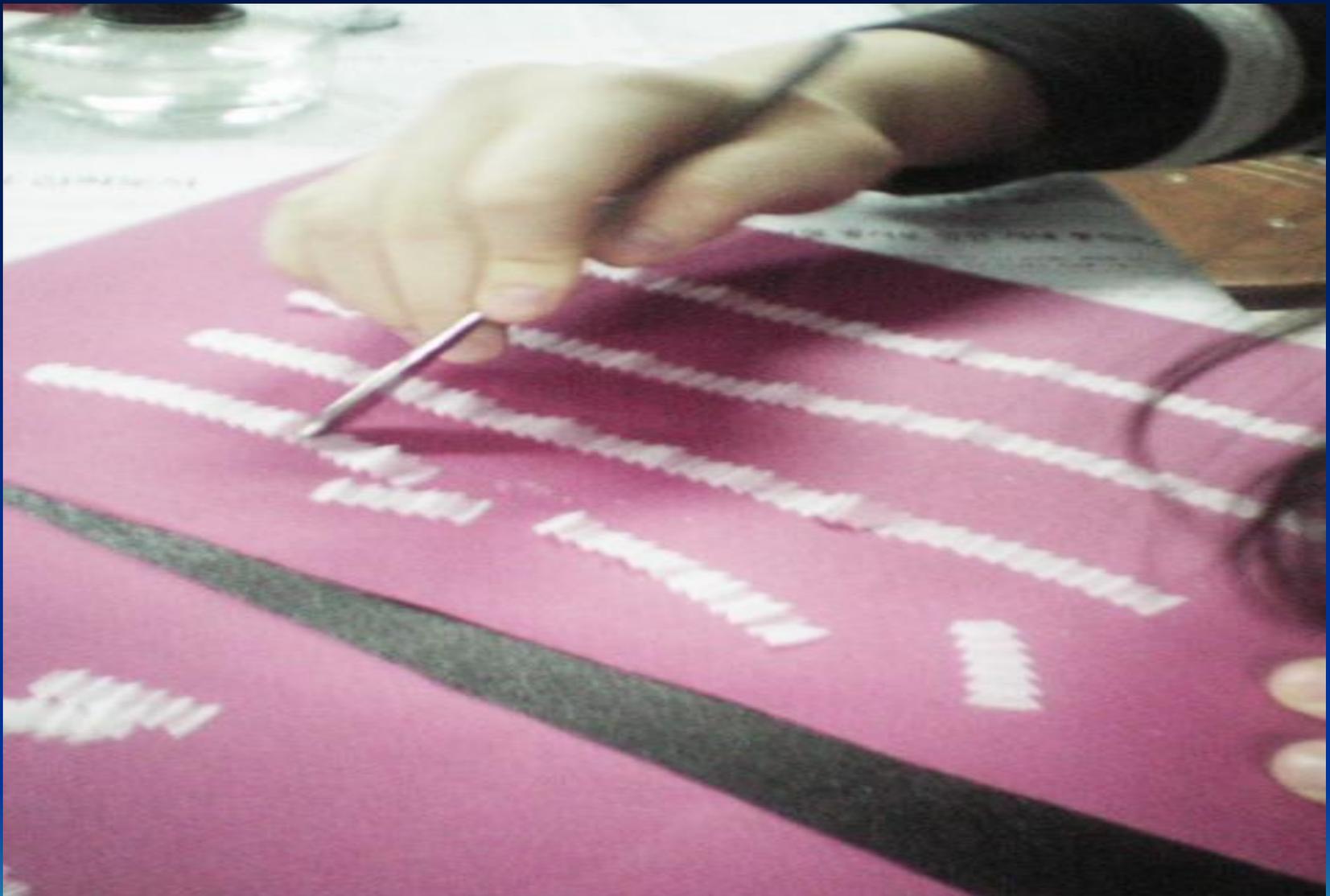
용감하게



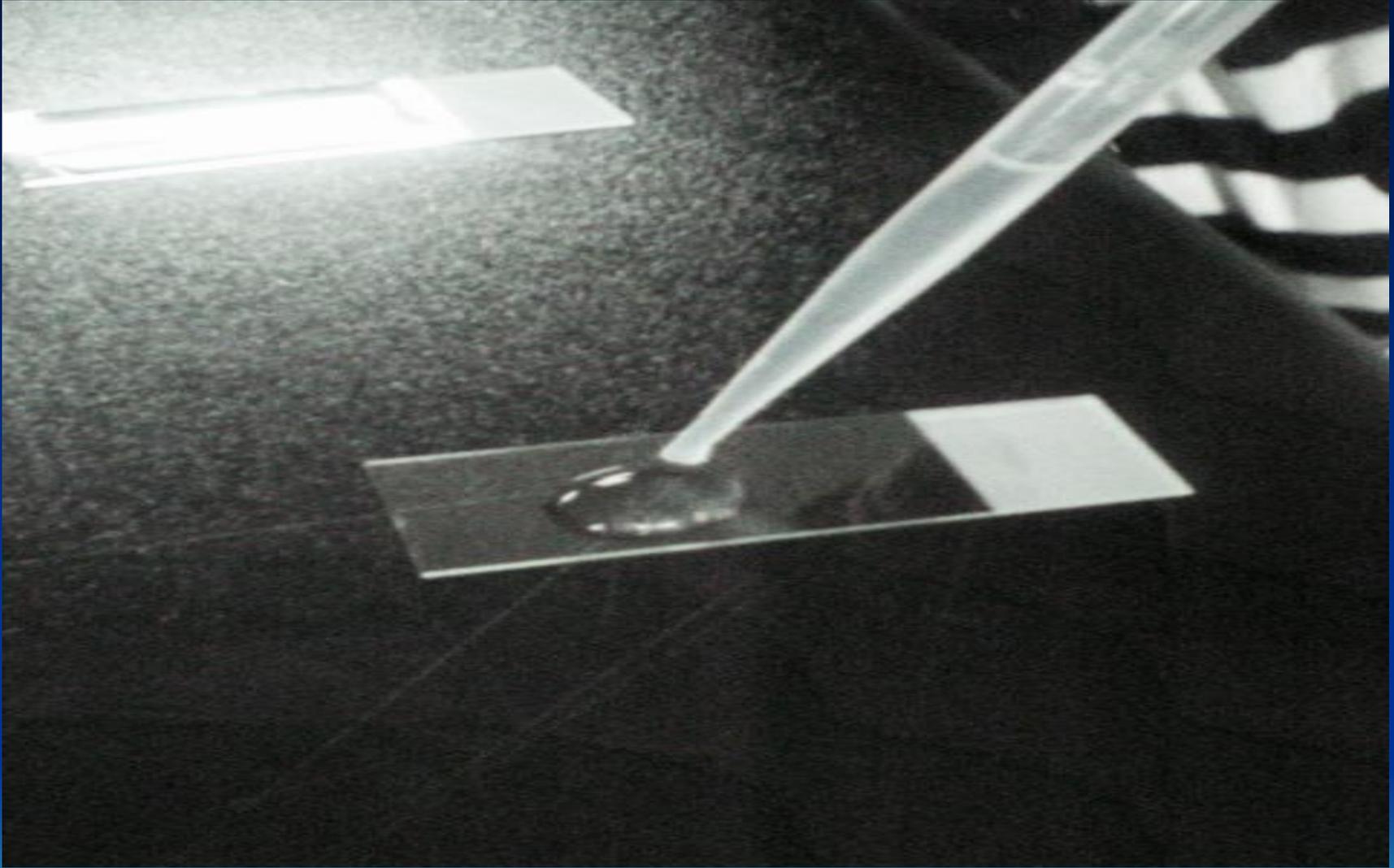
원격으로, 열려 있는
수업은

Whatman

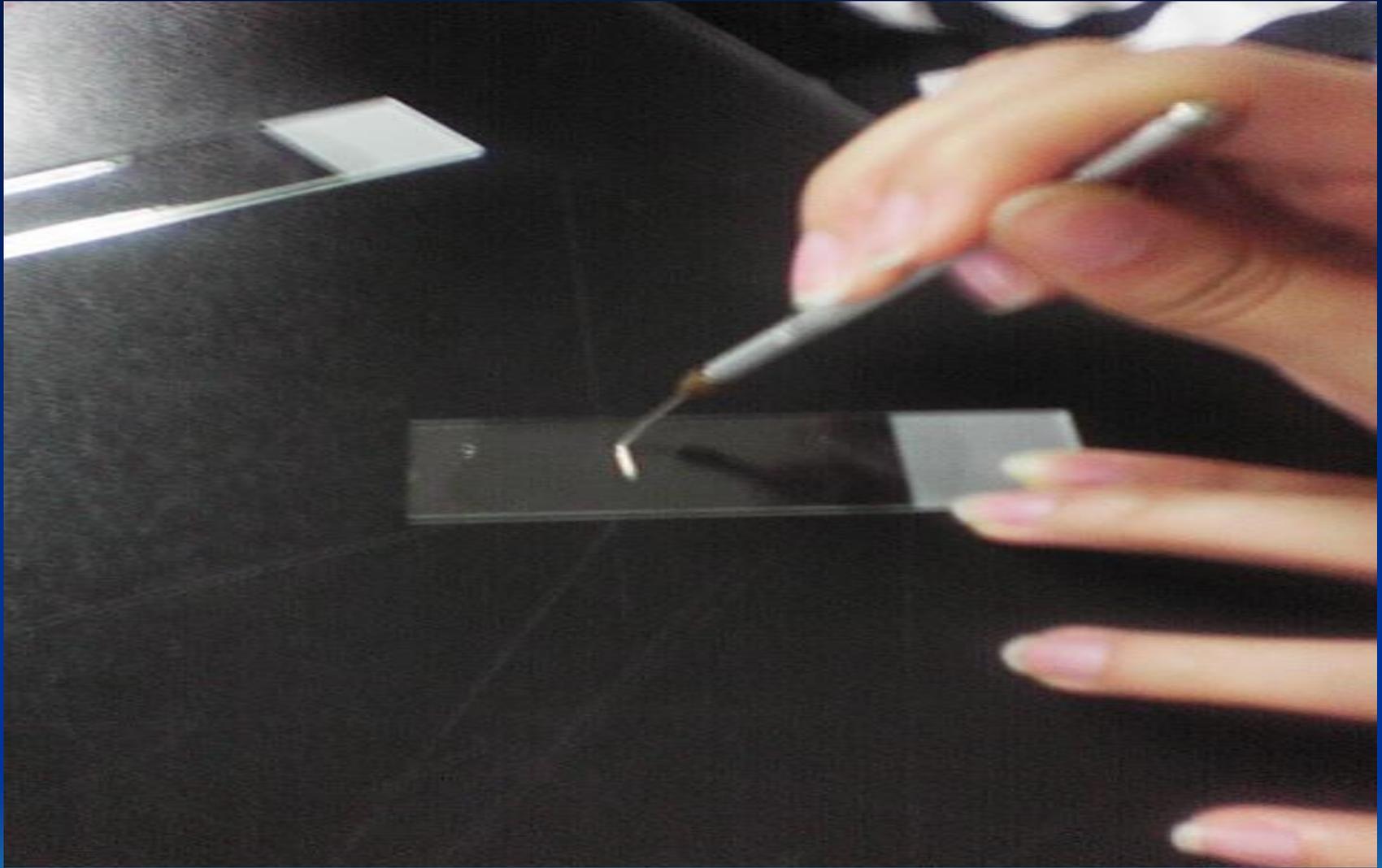
1



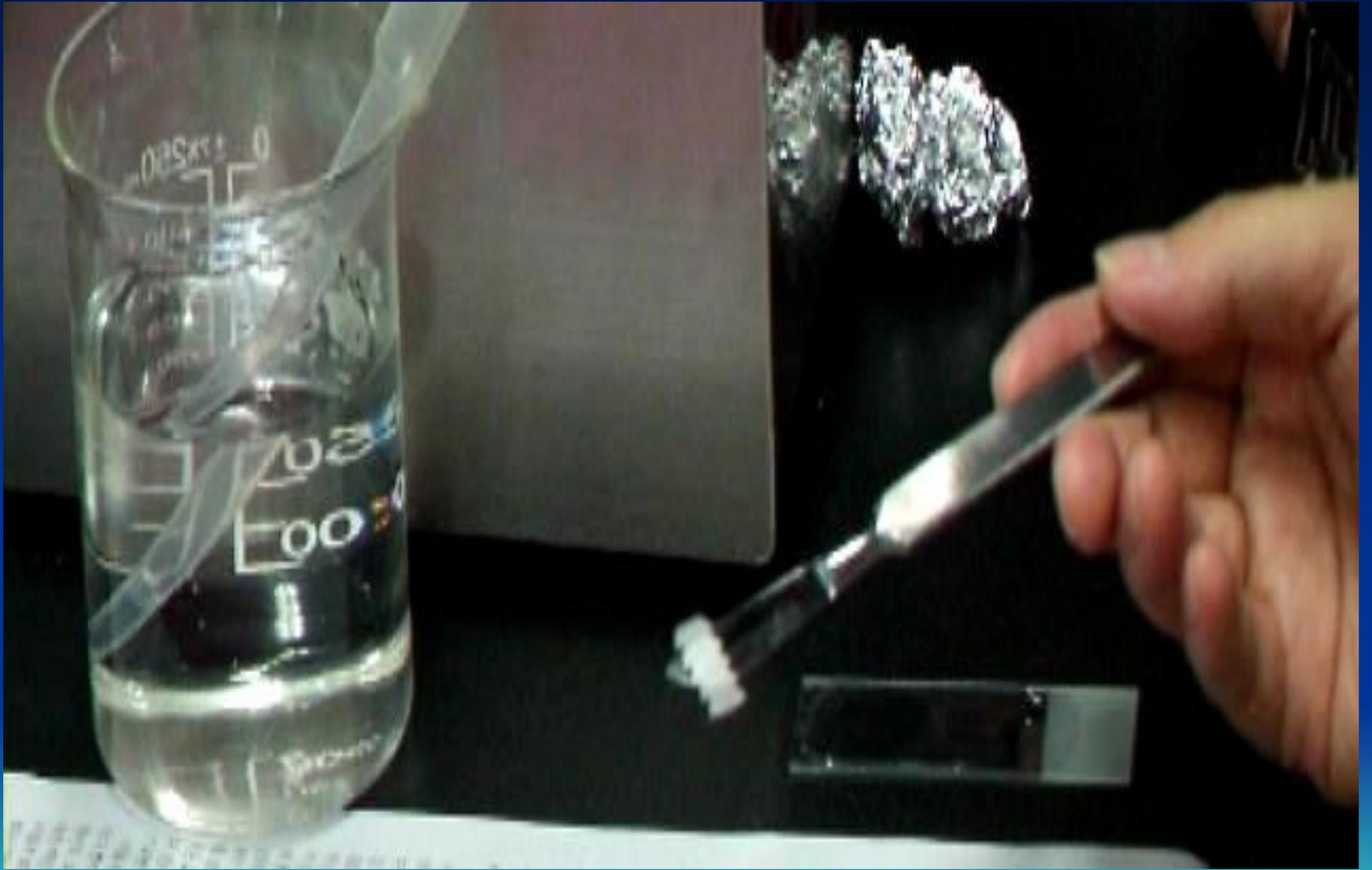
리본 자르기

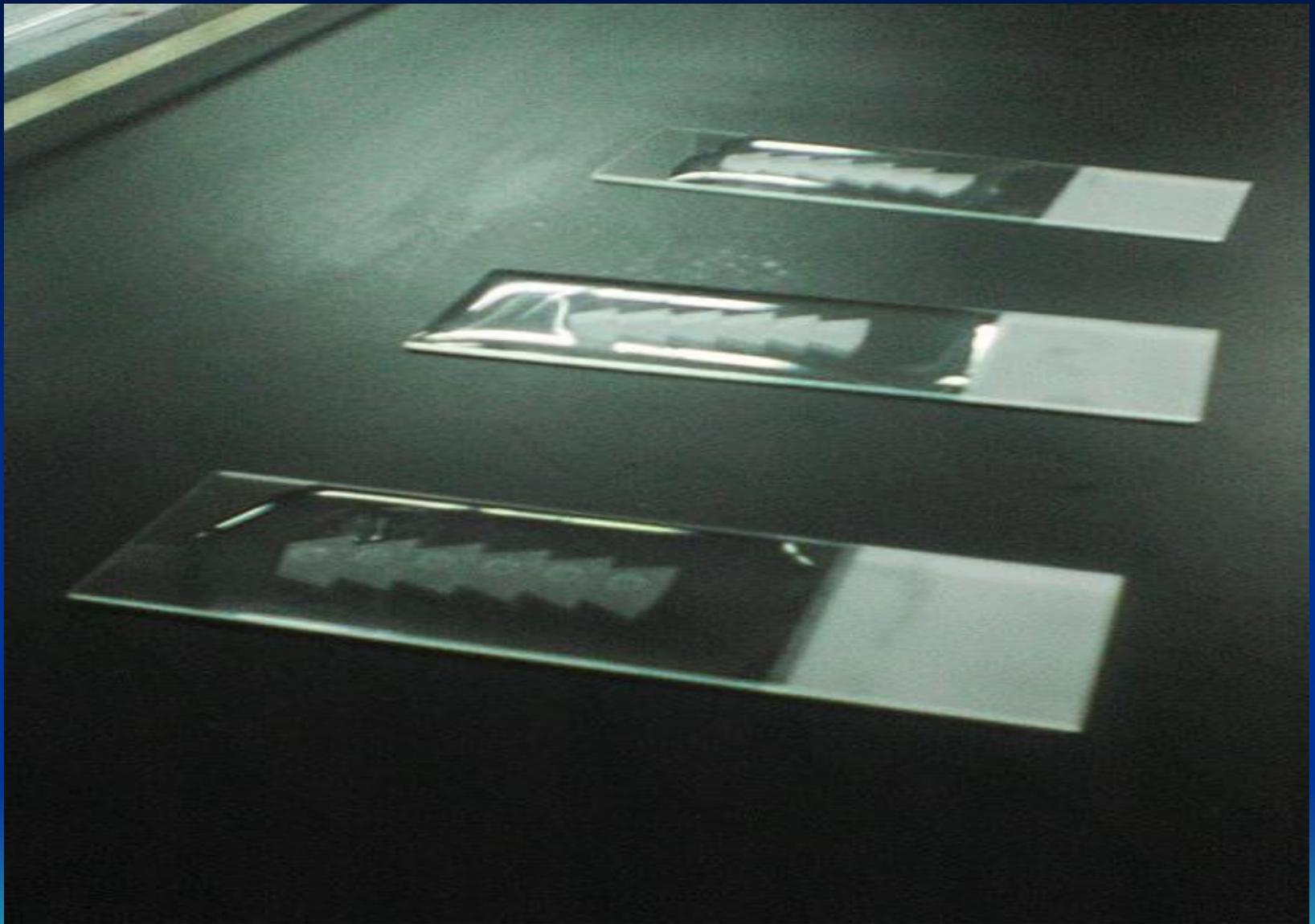


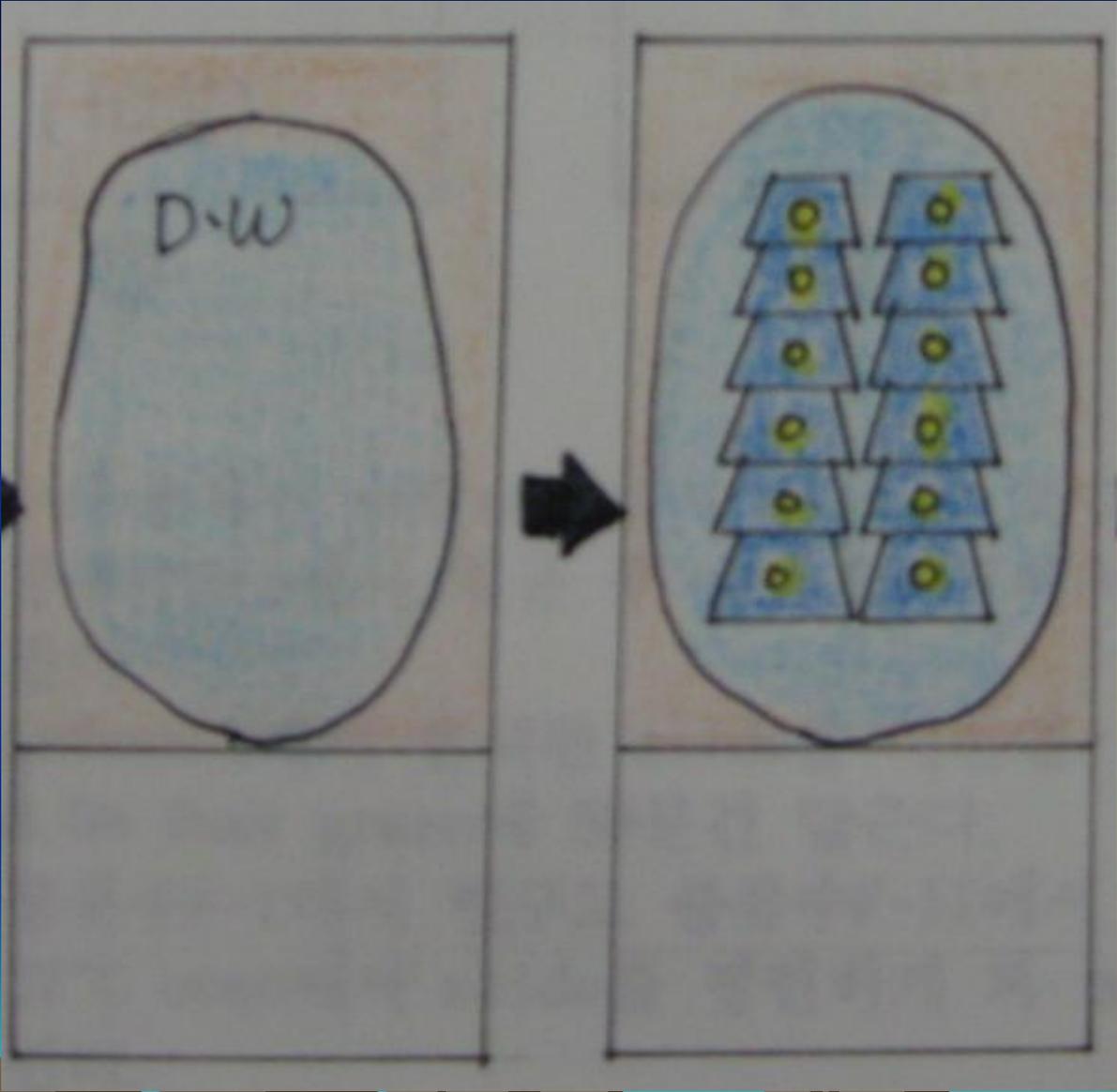
증류수 떨어뜨린 후



얇게 펴 바른다







제3절. Microtome의 종류

Microtome은 paraffin이나 celloidin 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($20\ \mu\text{m} \sim$) : 포매과정이 필요하지 않고 $10\ \mu\text{m}$ 간격으로 절단이 가능하다.

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



제4절. 파라핀 절단에 영향을 미치는 요소

(1) Quality of the paraffin

grainless 이어야 하고, very fine grained texture
이며, bubble 과 opaque spots 가 없어야 하고,
모래나 다른 debris 가 없어야 한다.

(2) Proper infiltration

해부 현미경이나 돋보기를 사용하여 material을 보
았을 때 tissue 가 부숩었다면 이는 infiltration 이
잘못되었다는 것을 의미하고, 또 tissue의 과도한
hardness 와 brittleness를 의미한다.



(3) Orientation of mounted material

material 주위를 싸고 있는 paraffin 이 rectangular 하게 trimmed 되어야 하고, material은 옆에서 보았을 때 paraffin의 center 에 있어야 한다.

(4) rigidity of mounting

이상적으로 material은 mounting block or disk에 단단히 붙어 있어야 한다. 그래야 microtome이 덜 거덕거리는 것을 막고 균일한 절편의 두께를 이룰 수 있다. (불균일한 절편의 두께는 staining process 를 해 보면 두꺼운 절편이 더 진하게 염색되기 때문에 알 수 있다)



(5) Temperature

Cutting quality가 paraffin block의 temperature에 의해서 큰 영향을 받는다. 가장 좋은 결과는 실온에서 microtome을 사용할 때 이다.

1) 만일 knife와 block의 어느 것이라도 온도가 너무 높으면 section이 문드러진다. Thick section이 높은 온도에서는 thin section 보다 more tolerant.

2) 만일 온도가 너무 낮으면 section 과정에서 사용된 paraffin이 ribbon을 형성하지 않는다.

(6) Hardness or brittleness of the material.

위의 모든 조건을 따랐는데도 만족할 만한 section 과 ribbon이 만들어지지 않았다면 warm water 처리를 시도한다.

제5절. paraffin sectioning defects

(1) 대부분 section시 어려움은

1) microtome knife의 shatpening 정도

2) 올바른 knife의 angle의 정도 ; try and error 로 결정. 만일 각이 크면 block이 깨끗하지 않고 return stroke, 각이 작으면 절편 compressed.

(2) knife에 paraffin, crystals, dirt particles, and tissue fragments가 묻어있으면 ribbon이 갈라 지거나 굽힌다.



(3) section01 compression을 일으키는 원인.

1) knife가 너무 뜨거울 경우

2) block이 너무 뜨거울 경우

3) paraffin 이 xylene 에 오염되어 너무 soft 하게 된 경우

4) knife 각도가 너무 작은 경우

5) 절편의 두께가 너무 얇은 경우

6) knife 가 block이 단단하게 고정되지 않은 경우

7) 칼 날이 무딘 경우



(4) Coved ribben이 생기는 원인.

- 1) knife 에 무딘 부분이 있는 경우 - knife dml 위치를 바꾸거나 sharp knife로 바꾼다.
- 2) paraffin block 의 위쪽과 아래쪽이 평행이 아닌 경우 - razor blade 로 다듬는다.
- 3) paraffin block의 아래쪽이 knife 날과 평행이 아닌 경우 - object clamp를 조정한다.
- 4) tissue 조각이 paraffin의 중앙에 위치하지 않은 경우 - unegual side를 다듬는다.
- 5) tissue 조각의 모양이 irruler shape and bulk



제6절. Ribbon의 상태에 따른 defect 관찰

- (1) Fixation 시간이 너무 길어 material이 단단하게 된 경우 ; Section시 material이 microtome knife 와 접촉될 때 금속성의 소리가 나며, 재료가 부서진다.
- (2) Fixation 시간이 너무 짧은 경우 ;
microtome knife로 절단시 재료가 문드러짐.
- (3) Paraffin ribbon에서 재료가 분리되는 경우 ;
 - 1) Dehydration이 충분히 되지 않은 경우
 - 2) Paraffin embedding이 충분히 되지 않은 경우
 - 3) Aspiration이 충분히 되지 않은 경우

- (4) Section시 재료가 부서져 Fixation 시간을 단축시켰는데도 부서지는 경우; Dehydration interval 이 너무 길다.(Dehydration 시간을 단축시킬 것)
- (5) Paraffin embedding이 충분히 되지 않아 Paraffin ribbon이 material에서 분리 되는 경우; Mold를 53~55°C oven에 넣고 완전히 녹인 후, material을 꺼내 cold xylene에 넣고 chloroform을 xylene의 1/10 즙 부은 후 다시 Paraffin을 one or two spoon 넣고 infiltration 시킨다. 그 다음 포화가 되면 다시 oven에 넣고 bottom test를 할 때까지 진행한다.
- (6) Paraffin block 제작시 삐뚤어지면 정상적인 파라핀 리본이 형성되어 나오지 않는다.