

# 제14장. 전자현미경 시료제작

- **Electron Microscope; 전자 lens를 이용하여 시료를 관찰**
- **(1) Transmission electron microscope(TEM, 투과전자현미경)**
- **세포내부구조를 관찰할 경우 재료를 아주 얇게 잘라서 전자가 그 재료를 투과하여 상을 맺도록 한다. TEM은 1930년대 초에 최초 제작, 1934년 세균이 TEM으로 촬영, 본격적인 생물 재료 연구는 1950년대에 시작. TEM은 광학현미경보다 훨씬 높은 분해능을 갖고 있기 때문에 미세구조 관찰이 가능하다.**

- Resolving power(분해능); 가장 작은 두 점 사이의 거리를 식별하여 관찰할 수 있는 능력
- (ex) 사람 0.1 mm, 광학현미경  $0.2 \mu\text{m}$  ( $10^{-3}$  mm), TEM 0.1 nm ( $10^{-6}$  mm); 광학현미경 2,000배
- (2) Scanning electron microscope(SEM, 주사전자현미경)
- 물체의 표면구조를 관찰할 때 전자가 시료의 표면에서 반사되어 상을 맺도록 한다.

## • 제1절. TEM관찰을 위한 시료 제작법 요약

- (1) Fixation(고정); 살아 있는 식물재료를 화학적으로 안정된 상태로 만듦
- (2) Dehydration(탈수); 세포로부터 수분 제거
- (3) Infiltration(침투) and Embedding(포매); 세포에 수지(resin)를 침투, 포매
- (4) Thin Section(박편절단); 전자선이 투과할 수 있도록 ultramicrotome으로 얇게 잘단
- (5) Staining(염색); Uranyl acetate, Lead citrate 이중염색

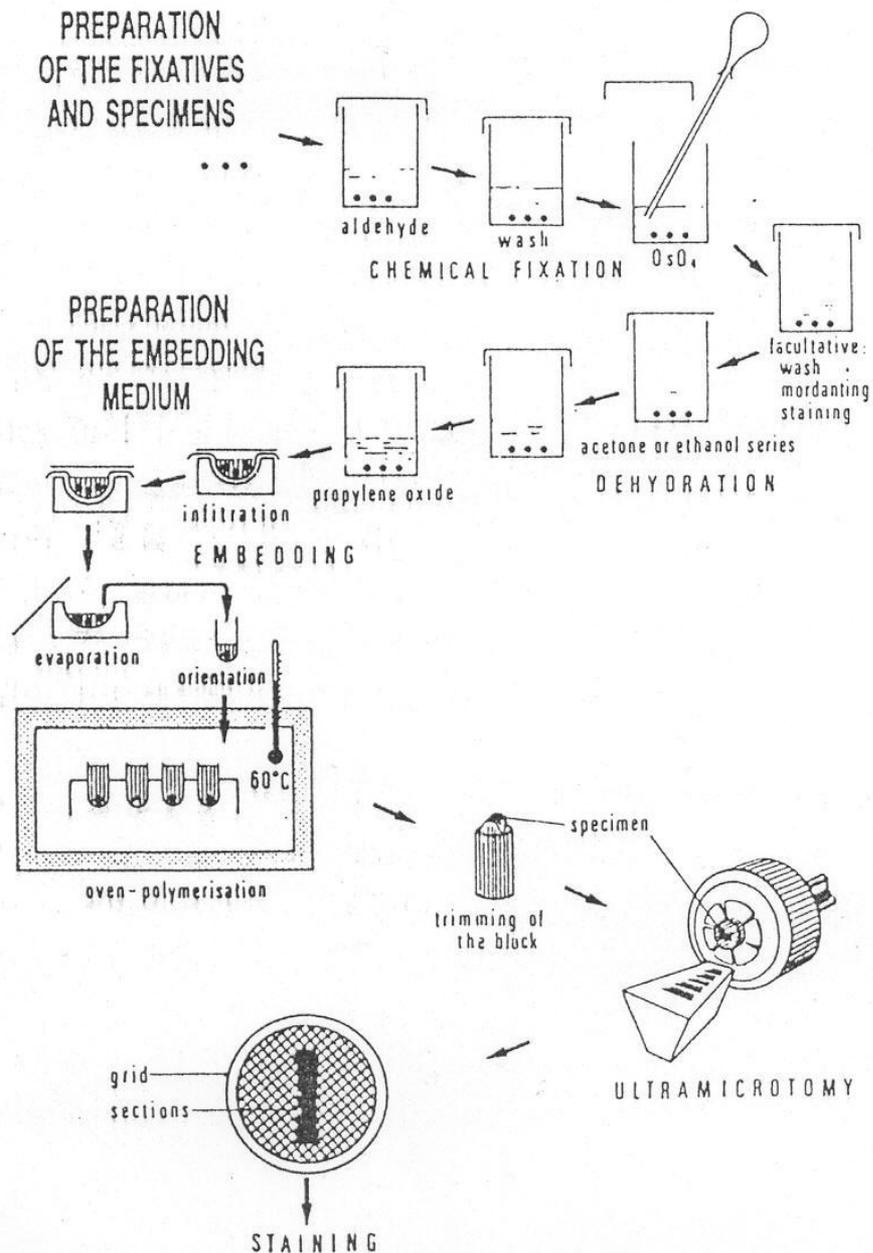


그림 1. 투과전자현미경 관찰을 위해서 재료는 고정, 탈수, 포매, 열중합, 블럭 다듬기, 초박절편 만들기, 절편염색 등의 과정을 거친다.

- 제2절. 고정, 수세, 탈수, 침투, 포매

- 1. Fixation(고정)

- 생물재료의 화학적 변화를 최소화하여 세포가 갖고 있는 원래의 미세구조를 가능한 한 그대로 보존. 화학약품을 사용하는 화학고정과 생체조직을 낮은 온도에서 얼리는 물리적 고정방법이 있다
- 좋은 화학 고정액; 세포내용물의 화학적 안정과 교차결합이 가능하도록 하며, 시료속으로 빠르게 침투해야 한다. 이중고정을 한다.

- ① 전고정(prefixation)

- 세포의 단백질 성분을 빠르게 안정화 시킨다. paraformaldehyde(0.5-4%), glutaraldehyde (2-6%) 등을 pH 6.8-7.2 0.02-0.2 M phosphate buffer, sodium cacodylate buffer 용액으로 만들어서 많이 사용. 실온에서 1-2시간 실시

- ② 후고정(postfixation)

- Osmium tetroxide( $\text{OsO}_4$ )를 사용, 강한 산화제, 단백질과 지질구조를 안정시킨다.  $\text{OsO}_4$ 기체는 매우 휘발성과 독성이 강하여 자극성이 있으므로 눈, 호흡기, 피부에 나쁜 영향을 줄 수 있으므로 반드시 hood 안에서 실시. 0.02-0.2 M 완충액(pH 6.8-7.2)으로 1-2%  $\text{OsO}_4$ 를 만들어 실온에서 30-90분 고정(또는  $4^\circ\text{C}$  냉장고에서 overnight)

- **2. Washing(수세)**

- 전고정후 완충액으로 각 15분간 3회 수세, 후 고정 후에도 마찬가지로 수세.

- **3. Dehydration(탈수)**

- 세포 내용물의 수축현상을 막기 위하여 천천히 실시, Ethanol, acetone을 상승농도 순으로 탈수. 탈수가 끝나면 포매제(수지 혼합액)의 침투를 돕는 치환제를 처리하는데, propylene oxide가 흔히 사용된다.
- 30% ethanol(or acetone) 5-15분(4°C) -- 50% -- 70% -- 80% -- 90% (실온) -- 95% - - 100% ethanol 15-45분(2회 교환) -- 100% propylene oxide 15-45분(2회 교환)

## • 4. Infiltration(침투)

- 포매제: 수지혼합액; Epon, Araldite, Epon-Araldite 혼합액, Spurr's resin
- Propylene oxide : 수지 혼합액 (G1) =  
3 : 1 15-30분
- Propylene oxide : 수지 혼합액 (G2) =  
1 : 1 30-60분
- Propylene oxide : 수지 혼합액 (G3) =  
1 : 3 60분(overnight)
- 100% 수지 혼합액 (G4) 12-24 시간

- **5. Embedding(포매)**

- 주사기를 이용하여 수지 혼합액을 주형 (mould)에 채우고 재료를 넣은 다음 방향을 맞춘다. 주형은capsule 또는 고무판 flat mould를 사용한다.
- 재료가 들어 있는 Epon혼합액을 굳히기 위해서는 45°C oven 속에서 10-20시간 그리고 60°C에서 24-40시간 동안 열중합 (polymerization)시킨다.

- **제3절. Section(절단)**

- 열중합으로 굳어진 블록을 재료가 표면에 나오도록 칼로 다듬은 후(trimming), 물받이(boat, trough)를 부착시킨 유리칼(다이아몬드칼)로 ultramicrotome(초박절편기)으로 절단한다.
- ① **유리칼 만들기**; 유리칼 제작기(knife maker)를 이용하여 가로 세로 1인치의 정사각형 유리를 대각선으로 절단하면 2개의 삼각형 유리조각이 나오는데, 이 중 끝이 날카로운 쪽이 유리칼로 사용된다. 만들어진 유리칼은 먼지 등이 닿지 않도록 상자(knife box)에 보관한다.

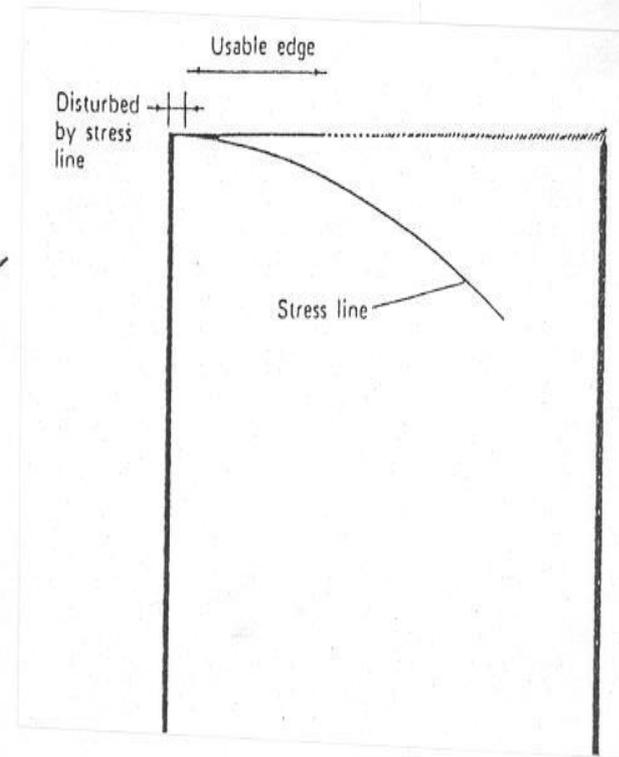
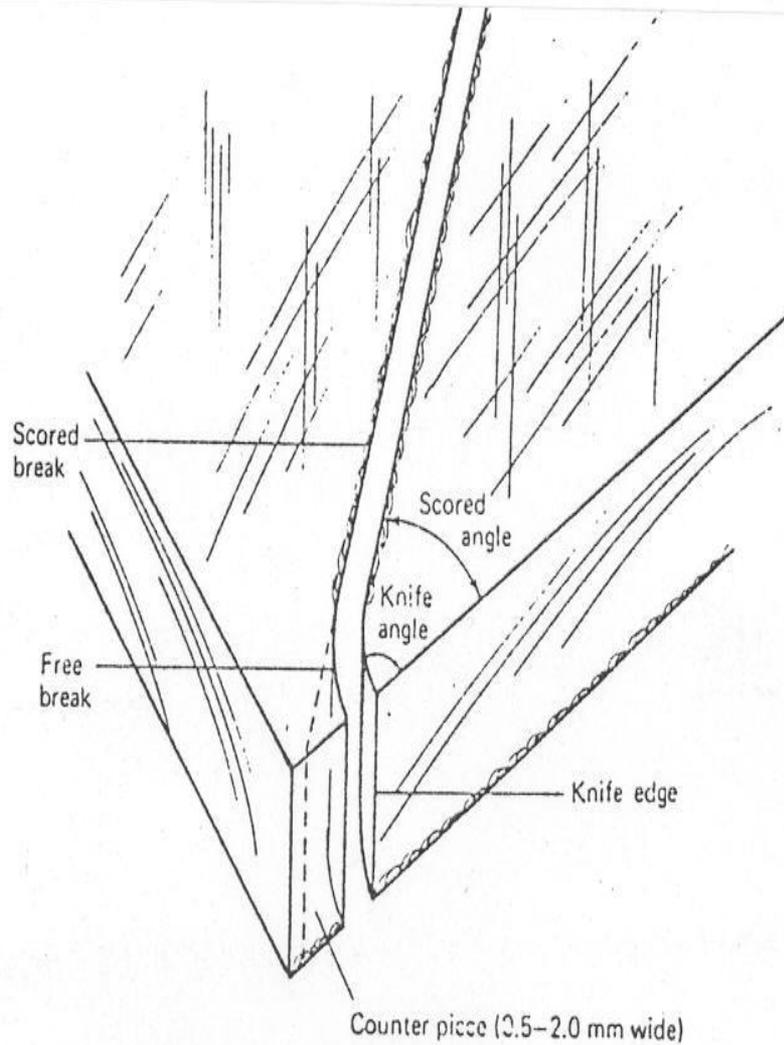


그림 2. 유리칼은 오른쪽에 있는 칼날의 반대쪽에 있는 “나머지 부분”의 폭을 보면 좋은 칼이 만들어 졌는지 판단할 수 있다.

- ② **물받이(boat) 만들기**; 절편을 모으기 위해서 칼에 물받이를 부착시켜야 한다. 물받이에는 증류수를 채우는데, 물이 칼날위로 넘치지 않도록 해야 한다. 이런 물받이가 달린 유리칼을 ultramicrotome에 장치하고 절편을 자르면 절편들이 연속적으로 붙어서 물 표면 위로 뜨게 되어 ribbon을 형성한다.

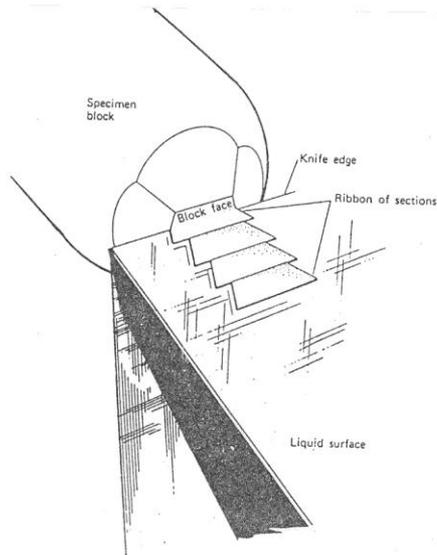


그림 3. 유리칼에 의해 블록으로부터 잘라져 나온 절편들이 연속적으로 서로 붙어서 리본을 형성한다. 이러한 리본은 물받이의 물 표면 위에 떠있다.

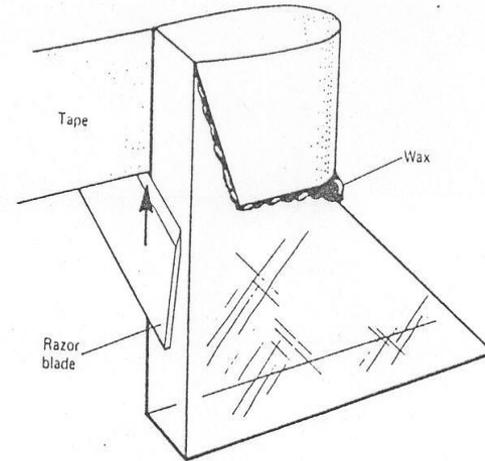


그림 4. 유리칼날의 높이와 수평이 되도록 테이프를 좌우측면에 붙이고 나머지는 면도날로 자른 다음, 유리 and 테이프가 만난 부분을 왁스나 파라핀으로 밀봉하여 물이 새지 않도록 한다.

- ③ **블록 다듬기**; 블록을 사다리꼴(밑변 0.5 mm, 높이 1 mm, 윗변은 밑변의 반 이하)로 다듬어야 한다.

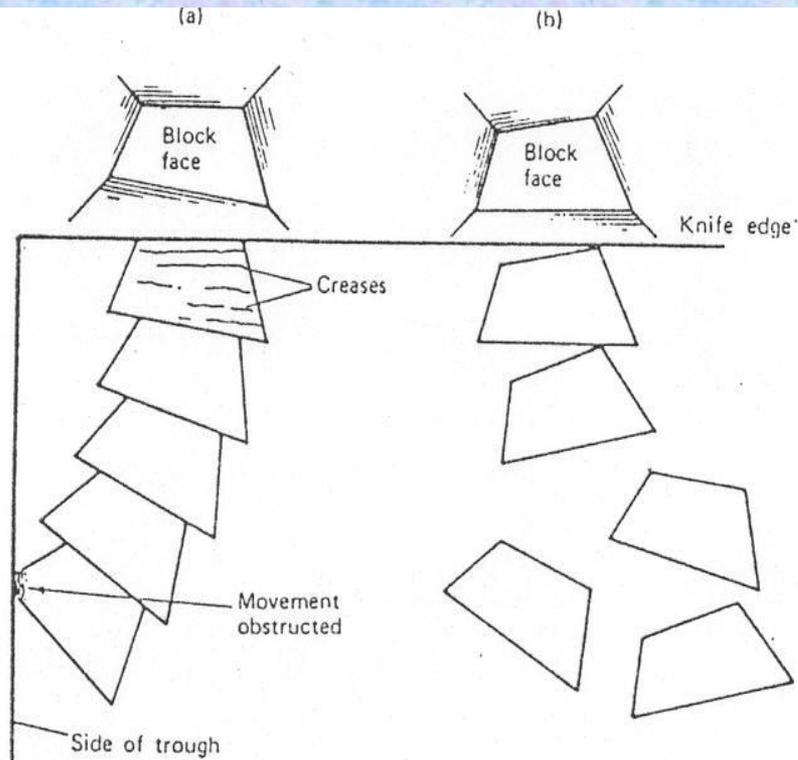


그림 5. 블록 표면의 사다리꼴에서 위변과 밑변이 평행하게 다듬어지지 않아서 (a) 리본이 한 쪽으로 굽거나, (b) 위변이 칼날과 평행하지 않아서 절편이 리본을 만들지 못하고 하나 하나 떨어진다.

- ④ 두꺼운 절편 만들기;
- 조직에서 TEM으로 관찰할 부위를 확인하기 위하여 1-2  $\mu\text{m}$  정도의 두꺼운 절편(thick section)을 만들어서 광학현미경으로 관찰해야 한다.
- 절편 운반기구(백금선 고리)를 이용하여 물받이의 물 표면에 떠 있는 절편을 D.W. 한방울 떨어뜨린 slide glass에 옮긴 후 40-50°C 열판(hot plate)위에서 2-3 분 건조시킨 후 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한다

- ⑤ **얇은 절편 만들기**; thick section으로 전자현미경으로 연구해야 할 부분(세포)을 정확히 확인한 다음 얇은 절편(ultrathin section)을 만든다. 이때 절편의 색깔을 보고 대충 두께를 알 수 있는데, 금은색(90 nm), 은색(60-90 nm), 회색(25-50 nm) 등의 절편이 관찰에 적당한 두께이다.
- ⑥ **Grid에 얇은 절편 올리기**; 적당한 두께의 얇은 절편이 만들어졌으면 전자현미경속에서 절편을 지지할 수 있는 grid에 절편을 올려야 한다. Grid는 직경 3 mm의 많은 구멍(200-300)이 뚫인 그물모양의 원형 구리이다.

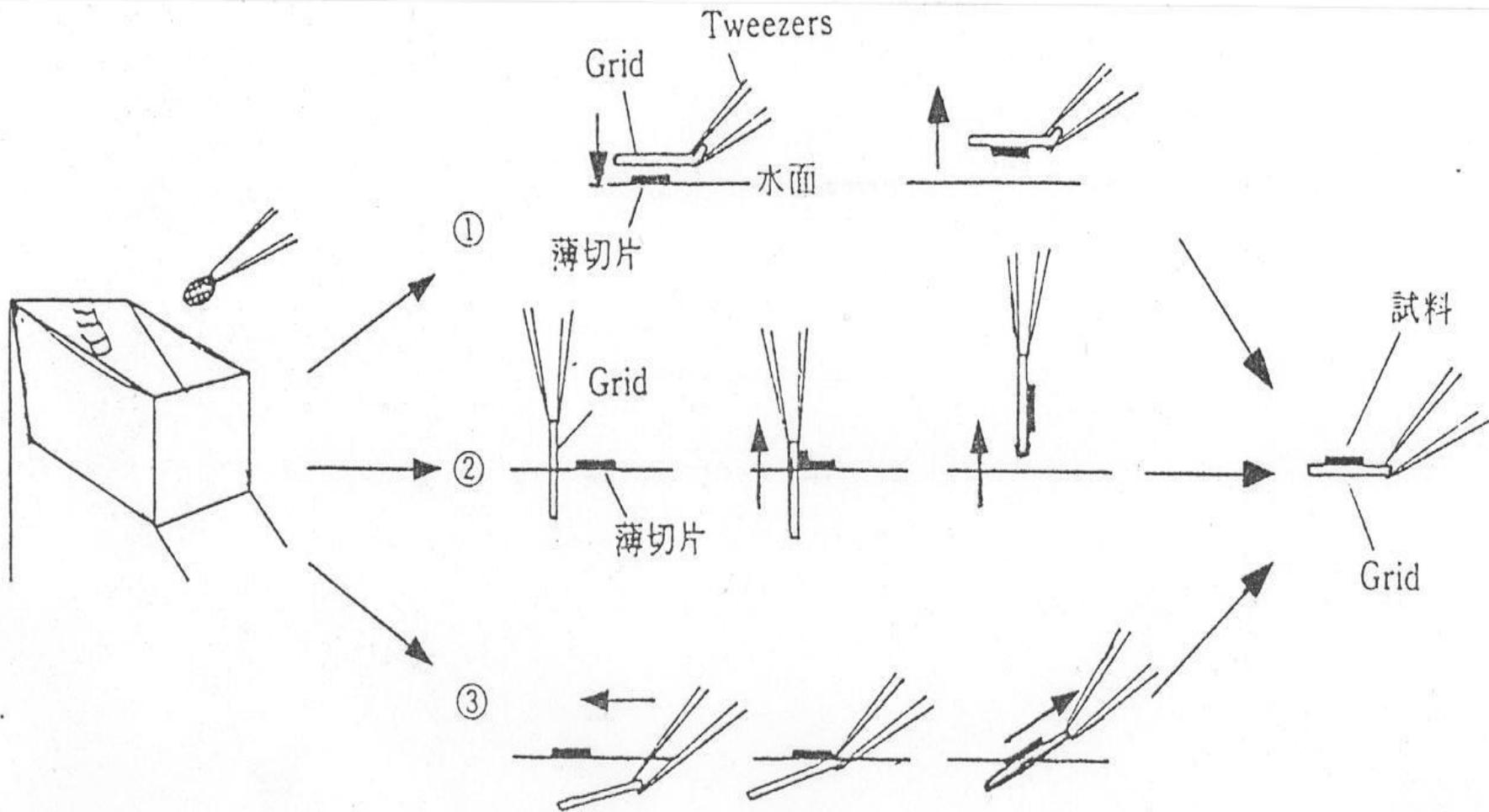


그림 6. 절편리본을 그리드 위에 올리는 세 가지 방법.

- **제4절. 염색(Staining)**

- 전자현미경 관찰을 위한 염색은 중금속염인 uranyl acetate와 lead citrate를 사용하는데, 전자는 단백질 및 핵산과 결합하고, 후자는 지질과 반응한다.

- **① Uranyl acetate 염색**

- 1-2% uranyl acetate 수용액 또는 70% ethanol로 만든다. petri dish 속에 parafilm을 놓고 그 위에 염색액을 한 방울 떨어뜨린다. Grid의 절편이 직접 염색액에 닿도록 염색액위에 띄워 놓고 petri dish 덮개를 덮는다. 10-30분간 염색한 후 grid를 증류수로 씻은 후 grid를 여과지위에 놓고 실온에서 건조시킨다.

- ② Lead citrate 염색

- 이 염색액은 공기에 노출될 경우  $\text{CO}_2$ 와 결합하여 침전물(lead carbonate)을 형성하기 때문에 완전히 밀봉하여 보관해야 한다. uranyl acetate 염색법과 같은 방법으로 염색하나 petri dish 속에  $\text{CO}_2$ 를 흡수할 수 있도록 작은 용기속에 NaOH 또는 KOH를 넣어 둔 상태에서 염색을 시작해야 한다. 4-5분 염색한 후 grid를 증류수로 수회 세척하고, 건조하여 grid 보관상자에 보관한다. lead citrate 염색은 가능한 한 신속하게 진행하여 납 성분의  $\text{CO}_2$  결합기회를 최소화하는 것이 중요하다.

