

Cryostat에 의한 동결 slide 표본의 제작

Makoto Hiroyasu

병리진단에 있어서 조직의 병변과 조직내부의 단백질·당쇄의 위치, DNA·RNA의 존재 등을 알기 위해서는 세포·조직의 형태 그대로 보존한 상을 현미경으로 관찰할 필요가 있다. 이러한 경우 조직을 얇게 자른것(수 μm의 두께)을 slide glass에 붙여, 각종 염색·처리 등의 작업을 해야된다. 이와 같은 병리표본의 제작 방법에는 paraffin 절편 제작법과 동결절편제작법이 있어서 진단의 필요성에 따라 이들 중 어느 쪽을 선택한다 해도 이점과 결점이 있고 단순하게 어느 쪽이 좋다고는 말할 수 없으나, 일반적으로는 HE 염색(Hematoxylin·Eosin)과 특수염색(Azan·Malbry 염색, Silver impregnation 염색 등)에는 paraffin 절편이 적합하며, 지방염색(Zudan 염색)과 *in situ* hybridization법에는 동결절편으로 양호한 결과를 얻을 수 있다. 면역조직 화학염색으로는 사용하는 항체의 특성과 필요에 따라 그중 한 쪽을 선택한다. 여기서는 동결절편의 필요성과 cryostat를 사용한 기본적인 동결절편 표본 제작법 [포매 block·slide 표본(면염색 표본)만드는 법]에 대해서 소개한다.

■ 동결절편 표본에 대해서

동결절편 표본이라고 하는 것은 동결시킨 표본을 cryostat로 절편하여 제작한 것이다. 이 경우의 표본은 채취한 재료(장기 또는 시료)를 동결조직 포매제(OCT compound)로 감싸 동결시킨 것이며 cryostat는 -10~-40℃ 정도의 저온도하에서 microtome에 의한 미세 절단을 가능하게 하는 기계이다. 그럼 어찌서 paraffin 절편이 아닌 cryostat를 사용하여 동결절편을 제작할 필요가 있는 것일까? 그것은 동결절편 제작의 경우에는 paraffin 절편 제작시에 필요한 유기용제와 가열 등의 처리가 없으므로 세포내의 단백질·지질·가용성 항원물질 등의 유출이나 실활 없이 신속하게 진단할 수 있고 전자현미경 수준의 위치확인도 가능하다는 등의 이유 때문이다. 아래에 동결절편의 장점과 단점을 서술하였다.

【장점】

- ① Paraffin 절편에 비해 항원성이 우수하게 유지된다.
- ② 지질이 유출되지 않으므로 지방염색이 가능하다.

- ③ 전자현미경 수준의 면역조직 화학염색의 위치관찰이 가능하다.
- ④ 표본제작 시간이 빠르고 신속한 진단이 가능하다.

【단점】

- ① 광학현미경 수준의 조직의 형태·구조 보존은 paraffin 절편에 비해 몇 단계 떨어진다.
- ② 시료의 보존가능기간이 비교적 짧다(-80℃에서 수개월은 보존가능).

■ 동결절편 표본의 제작법

(1) 필요한 기구 및 시약

- 동결용 포매제(OCT compound 등)
- 동결용 액체질소, 또는 드라이아이스·에탄올(드라이아이스·아세톤)
- 고정액이 필요한 경우: 고정액(10% formaline, 4% paraformaldehyde 등)
- 고정액이 필요한 경우: Sucrose
- PBS(인산 완충생리식염수)
- 동결용 포매접시(없으면 대신 알미늄 호일 등으로 접시를 제작해도 된다.)
- Slide glass(silane 등의 코팅 slide가 좋다.)
- 염색바구니(slide를 세우는데 필요)
- Cryostat(라이커사, 브라이트사 등)
- Dryer(냉풍건조용)

(2) Block 제작

동결절편을 제작하기에 앞서 처음 고정된 기고정 동결절편으로 할 것인지 미고정 상태로 신선동결절편으로 할 것인지를 정하지 않으면 안 된다. 이는 목적으로 할 염색법과 조직에 따라 선택할 필요가 있으므로 중요하다. 동결절편에서 사용되는 일반적인 고정액은 10% formaline, 4% PFA(paraformaldehyde), Zamboni(PFA+피클린산)액 등이다. 고정함으로써 조직내부의 세포의 구조·물질을 부동화시킨다. 이들은 항원과 RNA의 보존도에 영향을 준다. 또 고정인지 미고정인지에 따라 다음의 조직에 약간 차이가 생긴다. 신선 동결절편의 경우 동결용 포매접시에 분주한 동결용 포매제에 적합한 장기를 그대로 절단하고 싶은 면을 아래쪽으로 하여 액체 질소 또는 드라이아이스·에탄

을 내에서 신속 동결시킨다. 동결시간을 가능한 한 짧게 하여 동상으로 인한 조직의 파괴를 최소한으로 줄일 필요가 있기 때문에 조직의 동결은 신속히 행해야 한다. 포매제가 하얗게 굳으면 동결은 완료되며 제작후 block은 -80℃에서 보존한다.

다음으로 기고정 동결절편의 경우는 필요 최소한으로 잘라낸 장기를 고정액에 잠기게 한다. 10% formaline을 사용할 경우에는 4℃에서 24시간 정도 (5 mm 정도의 크기) 고정한다. 고정한 후에는 고정액의 세정·치환조작이 필요하게 된다. 우선 10% sucrose/0.1 M PBS(4℃)에서 4시간 후, 15% sucrose/0.1 M PBS(4℃)에서 4시간 동안 잠기게 한다. 이들 작업을 하는 것으로 고정 장기는 cryostat로 cutting하기 쉬워진다. 세정작업 종료 후, 동결용 포매제시에 분주한 동결용 포매제에 침전하고 신선 동결 단편일 경우와 같이 동결·보존 작업을 실시한다. 건조되지 않도록 밀봉하여 -80℃에서 보존하면 조직은 수개월 보존가능하다.

(3) Cryostat에 의한 cutting

동결용 포매제를 사용하여 cryostat의 시료대에 동결 block을 붙인다. 시료대를 cryostat에 세트하고 microtome으로 cutting한다. 최초로 microtome의 절편의 두께를 10~20 μm으로 설정하고 cutting한다. 그 후 목적두께의 (3~10 μm)날로 바꾸어 main cutting한다. 최근 microtome의 날은 거의가 1회용이기 때문에 block에 닿게 날의 부위를 이동시키는 것만으로도 main cutting을 할 수 있다. 다음으로 cutting에 의해 종이와 같이 된 μm의 두께의 절편을 slide glass에 붙인다. Slide glass를 조속히 절편에 가까이 하면 절편이 slide에 붙으므로 간단하게 절편을 취할 수 있다. Slide glass에 붙인 절편은 그대로 신속하게 dryer의 냉풍으로 건조시킨다. 염색바구니에 세워서 냉풍을 쏘이면서 적어도 1시간 정도는 건조시킬 필요가 있다. 건조가 불충분하면 다음 염색작업 중에 조직이 떨어지고 만다. 이때 사용하는 slide는 silane 등의 코팅처리가 완료된 제품이 좋을 것이다. 코팅되지 않은 slide로는 염색처리 중에 절편이 박리될 가능성이 높기 때문이다. Cutting시의 설정온도에 대해서는 우선 -18~-20℃정도로 시도해 보는 것이 좋을 것이다. 그래도 박절하기 어려울 경우 설정온도를 -20℃부터 상하로 2℃정도씩 바꾸어 시도해 보자. 뇌와 신장의 경우는 -20℃보다 높은 온도, 유선 등의 지방조직을 많이 함유하는 조직일 경우에는 -20℃보다 낮은 온도가 좋다. 절편의 주름이 많이 생기면 온도가 너무 높은 것이고, 절편이 너털너털해 지면 온도가 너무 낮은 것이다. Cryostat와 포매제의 차이에 따라 적정온도는 달라지므로 다양하게 시험해보고 가장 박절하기 쉬운 온도를 찾아야 한다.

(4) 미염색 slide 표본의 보존

박절한 slide 표본은 완전히 건조시킨 후, 바로 염색작업에 사용하는 것이 바람직하다. 바로 사용하지 않을 경우는 slide glass case에 밀폐하여 -80℃에서 보존할 수 있다. 수개월은 보존 가능하지만 그다지 장기간 보존할 수는 없다. -80℃에서 보존한 slide glass를 재사용할 경우는 실온으로 되돌린 후, 완전히 건조시킨 후 사용한다. 이때 가능한 한 slide glass에 서리가 낄 정도의 급격한 온도변화는 피해야 한다.

■ 동결절편을 염색에 사용할 경우

Cryostat로 제작한 slide 절편을 염색할 경우, 신선 동결절편은 고정조작이 필요하다. 고정 하지 않으면 염색과정에서 조직의 박리·세포내 물질(항원 등)의 유출이 일어나고 만다. 이때 사용하는 고정액은 주로 10% 포르마린, 4% PFA, 아세톤, 에탄올 등으로 4℃에서 10분간 고정한다.

장기의 절단

↓

동결포매

↓ 드라이아이스·에탄올, -80℃

Cryostat cutting

↓ 4~6 μm, -20℃

냉풍건조

↓ 실온, 1시간

고정

↓ 4% PFA, 4℃, 10분간

세정

↓ 5분간, 3회, 실온

염색작업

그림 1 신선 동결 절편제작 chart

장기의 절단

↓

고정

↓ 4% PFA, 4℃, 4시간~24시간

10% Sucrose/0.1 M PBS

↓ 4℃, 4시간

15% Sucrose/0.1 M PBS

↓ 4℃, 4시간

20% Sucrose/0.1 M PBS

↓ 4℃, 하룻밤

동결포리

↓ 드라이아이스·에탄올, -80℃

Cryostat 절편

↓ 4~6 μm, -20℃

냉풍건조

↓ 실온, 1시간

세정

↓ 5분간, 3회, 실온

염색작업

그림 2 기고정 동결절편제작 chart

고정 후 포르마린계의 고정액이면 증류수로 씻어내고, 알코올계의 고정액이면 바람으로 건조시킨 후 증류수로 씻어낸다. 이 씻어내는 작업을 하는 것으로 수용성의 동결용 포매제가 떨어져나가 slide상에는 조직절편만이 남게 된다. 기고정 동결절편일 경우는 박절 · 건조시킨 후 그대로 증류수로 씻어낸다.

물로 씻어낸 후의 조작은 탈 paraffin후와 동일하게 해도 상관없다. 동결절편으로 면역조직 화학염색을 할 경우에도 최종적으로 탈수 · 투철 작업을 하여 영구표본으로 할 수가 있다.

동결절편 slide를 제작한 후의 염색작업은 paraffin 절편의 경우와 같으므로 여기서 설명을 생략한다.

■ 목적에 따른 동결절편의 제작

실험목적에 따라 조금씩 다르므로 부연 설명을 하겠다.

① 통상의 염색(HE, Azan · Mallory 염색 등)

고정액은 통상, 10% formaline을 사용하여 절편의 두께는 4~6 μm로 한다. 아세톤과 알코올계의 고정액으로 고정한 경우에는 formaline계의 고정액으로 고정을 한 조직과 비교하면 완성색조가 조금 바뀌게 된다.

② 지방염색(Zudan염색, oil red O 염색 등)

고정액은 통상 10% formaline을 사용하며 알코올계의 고정액은 지방성분이 용출하므로 사용하지 않도록 한다. 최종적으로 탈수 · 투철 작업도 하지 않는다. 염색 후는 수용성 투입제로 투입한다.

③ 면역조직 화학염색(형광항체법, 효소항체법)

고정액은 4% PFA 혹은 아세톤을 사용한다. 기고정 동결절편이나 신선 동결절편 모두 우선은 4% PFA를 시도해본다. 염색작업시간이 길기 때문에 박리방지를 위해서 silane 등의 코팅 slide를 사용하는 것이 좋다.

④ *In situ* hybridization (DNA, RNA)

고정액은 4% PFA로 사용한다. 표적이 DNA일 경우는 통상과 같이 취급해도 관계없으나, 표적이 mRNA일 경우는 주의해야 한다. RNA를 취급하는 방법은 RNase free의 조건하에서 작업을 해야 한다(장갑과 마스크를 착용하고 가능하면 RNase의 contamination을 방지할 수 있도록 한다). RNA의 경우에는 표본 제작시에 사용하는 기구류는 가능한 한 건열멸균, 혹은 DEPC로 처리한다. 시약류는 RNase free water를 사용하여 조제하며 절편의 두께는 5~10 μm면 된다. 염색 작업시간이 길기 때문에 박리방지를 위해서 코팅 slide를 사용하는 것이 좋다.

⑤ LCM (Leather · Capture · Microdissection)

세포를 보충할 필요가 있으므로 코팅하지 않은 slide를 사용해야 한다.(코팅 slide로는 접착력이 너무 강하여 세포를 채취할 수 없다). 신선 동결절편을 코팅하지 않은 slide에 붙여서 LCM을 하면 양호한 결과를 얻을 수 있다. 또 박절 · 부착후의 강제건조는 절대로 피해야 한다. 절편의 두께는 8 μm정도가 좋다. 4 μm이하의 초박절편은 세포 내용물(mRNA)이 유출된다.

■ 동결절편의 염색에

위의 방법을 기본으로 동결절편을 제작한 몇 개의 염색 예를 소개하겠다.

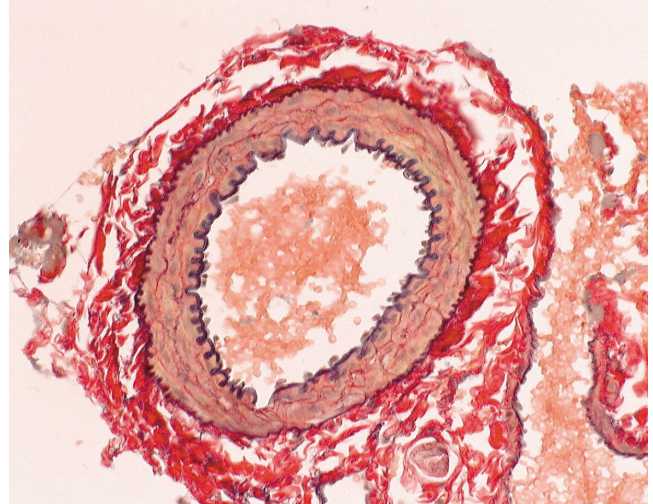


사진 1 EVG(Elastica van Gieson)염색

시료: Mouse 혈관의 formaline 기고정 동결절편. 탄성 섬유가검정색으로, 교원섬유가 적색으로, 세포질이 노란색으로 염색되어 있다.

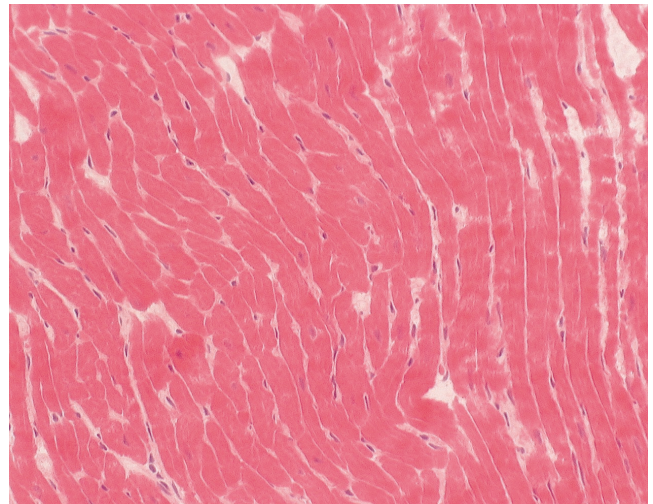


사진 2 HE(Hematoxylin · Eosin)염색

시료: 쥐 심장의 신선 동결절편, 박절 후 formaline 고정. 심근의 화상으로 근섬유가 관찰된다. 세포질은 적색으로 핵은 청색으로 염색되어 있다.

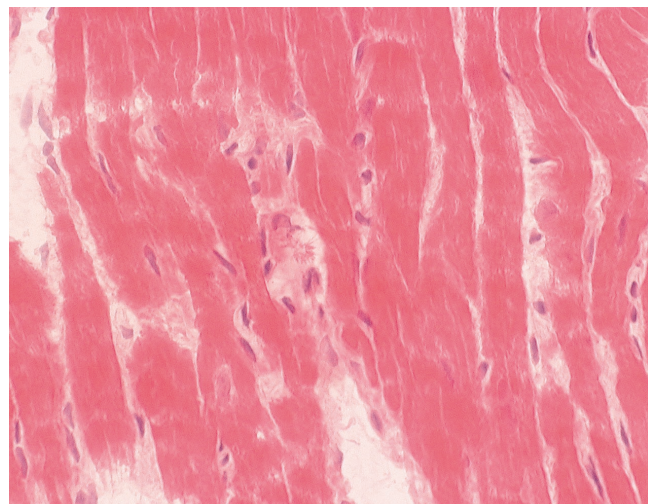


사진 3 사진 2 확대

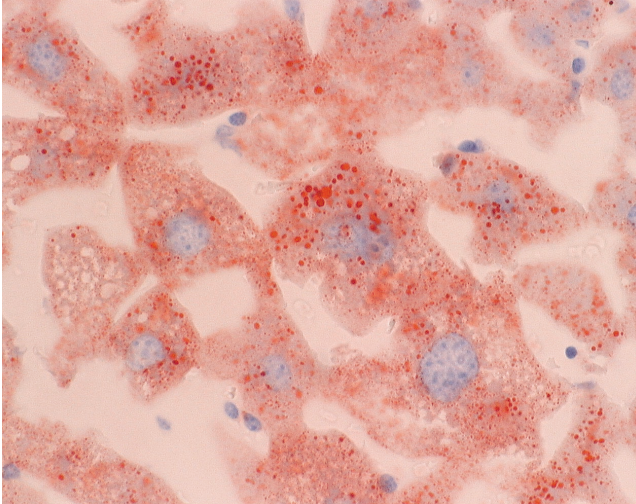


사진 4 지방염색(Oil red O 염색)
 시료: Mouse 간장의 포르마린 기고정 동결절편. 지방 방울은 oil red로 적색으로, 핵은 hematoxylin에 의해 청색으로 염색되어 있다.

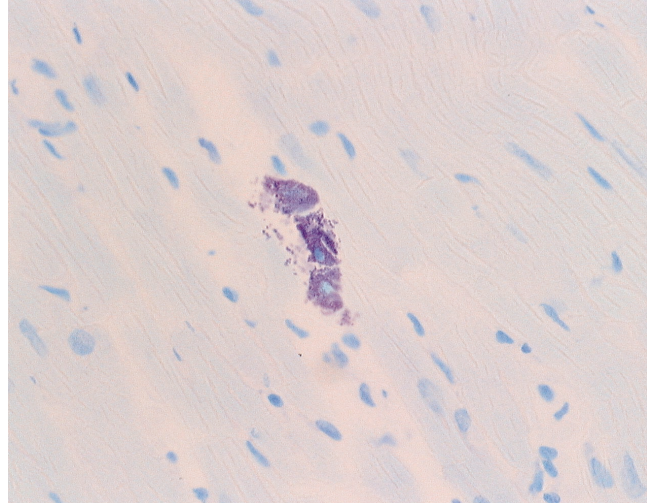


사진 5 TB(Toluidine Blue)염색
 시료: 쥐 심장의 신선 동결절편, 박절 후 formaline 고정. 메타크로마틴에 의한 마이크로퍼지가 자주색으로 염색되어 있다.

■ 마지막으로

최근에는 사용하기 쉽고 성능이 좋은 cryostat도 판매되고 있으며, 현재는 두께 몇 μm 의 동결절편의 제작도 가능하다. 기술이 숙달되면 paraffin 절편에 뒤지지 않는 표본을 제작할 수 있으므로 기술을 연마하여 아름다운 표본을 제작해 보자.

Bio21 인터넷 쇼핑몰

인터넷으로 제품구매도 하고 사은품도 듬뿍!
 쓰면 쓸수록 유용한 Bio21 마일리지

■ 마일리지 포인트별 사은품

- 30,000 - 헤어드라이기, 미니전화기 바디케아세트 등
- 50,000 - 커피메이커, 전동칫솔, 안마기 등
- 100,000 - 전자렌지, 즉석카메라, 전자 혈압계 등
- 200,000 - 자동카메라, 청소기, 워크맨, 휴대용 CD-Player, 접이식 자전거, 스캐너, 외장형 하드디스크, 20만원 상당의 TaKaRa 제품교환권
- 300,000 - 명품 선글라스, 오디오, TV, 소형냉장고, Sony VTR, 30만원 상당의 TaKaRa 제품교환권
- 500,000 - 소니 플레이스테이션2, DVD Player, Laser Printer, 디지털 카메라, 명품 핸드백, 15인치 LCD모니터, 팩시밀리, 50만원 상당의 TaKaRa 제품교환권

- 인터넷 쇼핑몰은 Bio21회원 전용 쇼핑몰입니다.
- 지금 바로 가입 하시면 다양한 정보를 받으실 수 있습니다.