

전자현미경적 효소 및 비효소에 관한 세포화학 연구의 실태

김 정 숙

연세대학교 의과대학

전자현미경의 현대의학에의 도입으로 여러분야에서 많은 이용과 높은 공헌을 하였음은 이미 기술한 바 있으며(Kim., 1975, 1978) 최근에는 전자현미경을 이용하여 세포내에 있는 효소 및 비효소성 물질의 소재를 확인하기 위한 조직 및 세포 화학적 방법이 점차 발전되어 가고 있다.

광학현미경적으로는 이미 많은 종류의 효소 및 조직화학적 방법이 개발되어 효소의 종류, 소재 및 분량등을 검색할 수 있어 진단 및 연구의 실용단계에 있다. 하지만 광학현미경적 방법으로는 효소 및 각종 화학물질의 정확한 소재를 알수 없기 때문에 이를 위하여는 전자현미경적 검색방법이 요망되었다. 그러나 광학현미경적 검색은 일반적인 염색반응에 의하여 이루어질수 있는데 비하여 전자현미경적 검색은 색깔보다 전자밀도에 의한 것이기 때문에 적당한 전자밀도를 나타내는 방법의 개발에 난점이 있었다.

그럼에도 불구하고 여러 학자들의 꾸준한 연구로 최근에는 전자현미경에 의하여 세포내의 여러 미세구조내에서 활동하는 효소의 존재를 알게 되었으며 예컨대 Golgi체나 lysosome내에 acid phosphatase가 존재하므로써 이물을 처리하는 과정등을 이해하게 되었고, 사립체나 핵 내에 존재하는 물질들의 존재를 확인할 수 있게되어 미세구조의 성분과 기능을 이해하는데 큰 도움을 주고있다. 이러한 연구로 오늘날 80여종의 효소가 생체내에 존재하고 있음을 알게 되었다.

각종 효소나 화학성분에 대한 전자현미경적 검색방법이 여러가지가 개발되어 있으나 지면 관계로 널리 이용되는 몇가지 방법을 간단히 소개하고자 한다.

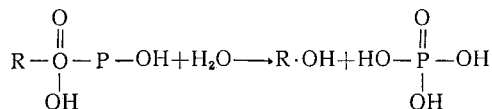
I. 효소성 세포화학적 방법

A. Phosphatase 증명법

효소의 증명법이란 조직 또는 세포내에 존재하는 효소를 국소에 고정시켜서 거기에 효소의 기질액을 작용케 하면 그 기질은 효소에 의하여 가수분해를 일으키면서 어떤 산물을 만들게 되는데 이 반응 산

물을 국소에 침착시켜서 가시적으로 관찰하는 것을 말한다.

phosphatase란 phosphoric acid 화합물로부터 phosphoric acid를 유리하는 효소를 뜻하는 것으로 이들의 작용은 다음과 같다.



Phosphatase검출 방법으로는 색소법, 금속법이 있으며 색소법은 sodium nitrate와 azur등의 여러가지 색소를 쓰는 방법으로서 이것은 산화 환원 효소를 증명하게 되는 방법이며 금속법은 가수분해하여 유리되는 phosphoric acid를 Ca, Cd, Pb등의 금속을 사용하여 침전시키는 방법으로 전자현미경적 관찰에는 주로 후자를 이용한다.

이러한 방법으로 여러 종류의 효소 반응이 효소의 종류에 따라 세포내에 다양하게 분포되어 있음을 알게 되었으며 몇가지 효소의 분포상태를 보면 다음과 같다.

1. Acid phosphatase는 pH4.5~5.5에서 가장 잘 활성화하며 주로 spleen(脾臟), prostate(前立腺), 肝의 Kupffer cell, 肺의 alveolar cell내 macrophage 등에 함유되어 있음을 알게 되었고 이 효소는 lysosome系 enzyme의 대표적인 것으로 주로 이물을 처리하는 효소로 알려졌다.(그림 2) (Gomori, 1952. Watson, 1958)

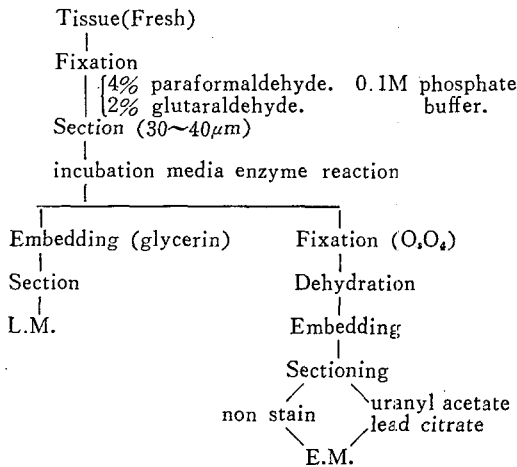
2. Alkaline phosphatase는 pH가 7.6~9.9사이에서 작용을 하며 phosphoric acid의 monobasic에 작용을 하며 주로 cell membrane에 존재하고 특히 腎의 proximal tubule(腎近立細尿管), capillary sinus(肝毛細膽管), intestinal villi, microvilli등에 강하게 존재함을 알 수 있다.(그림 1) (Barnett, 1959, Sobotini et al. 1963)

3. Glucose-6-Phosphatase는 glucose-6-phosphoric acid를 가수분해하여 glucose와 phosphoric acid를 유리시키면서 생기는 반응으로 pH6.7이 적당하며

liver, kidney, intestine에 많이 존재하며 주로 endoplasmic reticulum 내에 존재하는 효소이다. (Wachstein & Meisel, 1956)

4. Adenosine-triphosphatase는 세포의 운동이나 輸送에 중요한 역할을 하게 되며 mitochondria, membrane, 筋의 myocin내에 존재하며 그 이외에도 세포의 plasma membrane, 혈관의 내피세포내의 pinocytotic vesicle에 강하게 나타난다. (그림 1, 3) (Novikoff et al. 1958)

이들의 공통적인 방법은 아래와 같다.



II. 비효소계 세포화학적 방법

비효소계인 각종 세포성분의 종류와 소재를 전자현미경적으로 검색하는 방법도 활발히 개발되고 있으며 그중 대표적인 것이 핵산과 다당류의 검색법이다. 이들 방법 몇가지를 소개하면 다음과 같다.

A. Nucleic acid(핵산)

1. DNase 및 RNase법

세포내에 함유되어 있는 핵산의 소재를 확인하는 방법도 여러가지 있으나 1963년 Swift에 의하여 DNase(0.2mg/ml)나 RNase(1mg/ml)로 소화시켜 소화된 것이 아니하는 부위 즉 DNA, RNA의 부위를 확인하는 방법은 이미 오래전부터 이용하고 있는 방법중의 하나이다. (그림 4, 5, 6)

2. Feulgen반응을 응용하는 방법(Feulgen-derived techniques)

Marinozzi(1961, 1963)가 heavy metal을 이용하여 세포내에 부착하는 반응은 비교적 비특이적 반응을 알게 되었고 그후 Watson(1958a)이 thallium ethylate인 Schiff's reagent(hydroxyl binding reagent)를 사용하여 특이적으로 DNA에 반응한다는 것을 알게 되었다. 그 방법은 다음과 같다.

1. Fixation; 1.6% glutaraldehyde in 0.1M Sörensön buffer (pH 7.3), 1 hr at 4°C
2. Dehydration through 25, 50, 75, 90 and 100% acetone, 5 min. each
3. Acetylation, over night at 45°C with mixture solution(pure pyridine 60 vol. and anhydrous acetic acid 40 vol.)
4. Lavage; 3 times 10 min. each with pure pyridine. pyridine-acetone (1 : 1) 5 min 100% acetone, 3 times, 10 min. each
5. Impregnation; acetone-Epon mixture (1 : 1) 30 min.
6. Embedding; Epon 812
7. Sectioning
8. Hydrolysis; float section mounted on gold titanium grid over 5N HCl for 20-30 min
9. Rinse with water
10. React with Schiff's reagent (pararosaniline hydrochloride) for 30 min.
11. Staining with Thallium ethylate (1mg/ml) for 8-10 min.
12. Rinse with water
13. Coat with carbon (Omit 3, 4, and 8 for control)

이 방법의 결과로는 DNA를 함유하고 있는 미세구조들, 즉 chromatin, chromosome, bacterial DNA, DNA virus등에 강하게 양성으로 나타나게 된다 (그림 7, 8)

3. 그 이외에도 DNA의 소재를 파악하는 방법으로 Osmium Amine (OA) reaction으로 이것은 heavy metal인 polyamines를 이용한 방법으로서 osmium의 성분이 amine-chloro의 복합성분으로써 이것은 polynuclear ionic complex와 oxygen-bridge사이에 부착하는 성질이 있어 DNA 및 polysaccharide에 강하게 작용함을 Gautier 등(1973)이 이용한 방법이다. (그림 9) 그 방법은 다음과 같다.

1. Fixation with 1.5% glutaraldehyde in PBS (pH 7.3)
2. Dehydration
3. Embedding
4. Sectioning
5. Staining; put in 5N HCl at 20°C for 20 min. Rinse with water put in OA solution (100mg/10ml of 5N HCl) for 45 min at 20°C

Results:

DNA containing structures

B. Mucopolysaccharide 증명법

1954년 Myer에 의하여 Mucopolysaccharide의 생화학적 구조가 밝혀진 후 이 물질도 핵산, 단백질, 기질등과 같이 세포내에 존재하는 고분자의 일종으로 세포활동에 중요한 역할을 한다는 것을 알게 되었다. 특히 이 물질이 주로 세포막 외측에 분포하고 있음을 알게 되었고 세포막 내측에는 hyaloplasm으로 구성되어 있어 세포막은 복합체로서 형성되어 있음을 알게 되어 오늘날 cell membrane complex, 또는 junctional complex라고 부르게 되었다.

조직내에 들어 있는 mucopolysaccharide를 전자현미경으로 증명하는 방법은 여러가지가 개발되었으며 그중 많이 이용하고 있는 방법으로는 Ruthenium red (Luft, 1964, 1966), Alcian blue (Scatt, 1964, Rothman, 1969), Periodic acid methanamine silver (Swift & Saxon, 1967) 및 Concanavalin A (Agrawal & Goldstein, 1967)을 사용하는 방법 등이 있다.

다당류 검색은 oxidation method(酸化法)와 metal ion binding method(금속 ion 결합법)를 원칙으로 하고 있다. Ruthenium red는 1964년 Luft에 의하여 처음으로 전자현미경 관찰을 시도 하였으며 ruthenium이 mucopolysaccharide에 친화성이 있음을 이용한 방법으로, 신사구체 및 신경세포내 microtubule 등에 강하게 양성으로 나타난다. Alcian blue는 Barnett(1961)에 의해 결체조직내 다당류의 검색을 위하여 사용되기 시작하였다.

그러나 이 물질은 다당류뿐만 아니라 amin기에도 염색이 되는 단점이 있고 periodic acid methanamine silver방법은 다당류가 periodic acid oxidation에 의하여 aldehyde를 형성하는데 이때 methanamine silver로 염색하여 다당류를 관찰하는 방법으로 주로 신사구체기저막, 혈관벽기저막, synaptic vesicle 등에 선택적으로 염색이 된다.

Concanavalin A는 최근에 cell membrane 또는 접합 부위를 관찰할 목적으로 많이 이용되고 있는 방법으로 1960년 Avrameas가 lectins이 특별히 세포 표면에 부착되는 것을 발견한 후 연구되어 온 분야로서 Allen 등(1973), Cuatrecasas(1973)이 wheat-germ을 순수분리 하였고 Nagata와 Burger(1972)가 결정체로 만들어 concanavalin A라고 명명하여 사용하게 되었으며 이 물질은 암세포 표면이나 효소로서 처리된 정상 세포 표면에 특이하게 부착되는 특징을 알게 되었으며(그림 10) 그 방법은 다음과 같다.

1. Fixation, 2.5% glutaraldehyde in PBS, 1 hr

2. Treat Con A(50 μ g/ml) at 20°C, 15min.
3. Wash, 3 times with PBS
4. Treat peroxidase(50 μ g/ml) at 20°C, 15min
5. Rinse, 3 times with PBS
6. Treat DAB(diaminobenzidine 0.5mg/ml), 15min.
7. Post-fixation, 1% OsO₄, 1hr.
8. Dehydration
9. Embedding, Epon
10. Sectioning, 50 mesh with 0.3% formval film
11. Staining, lead citrate, 3 min.

Results:

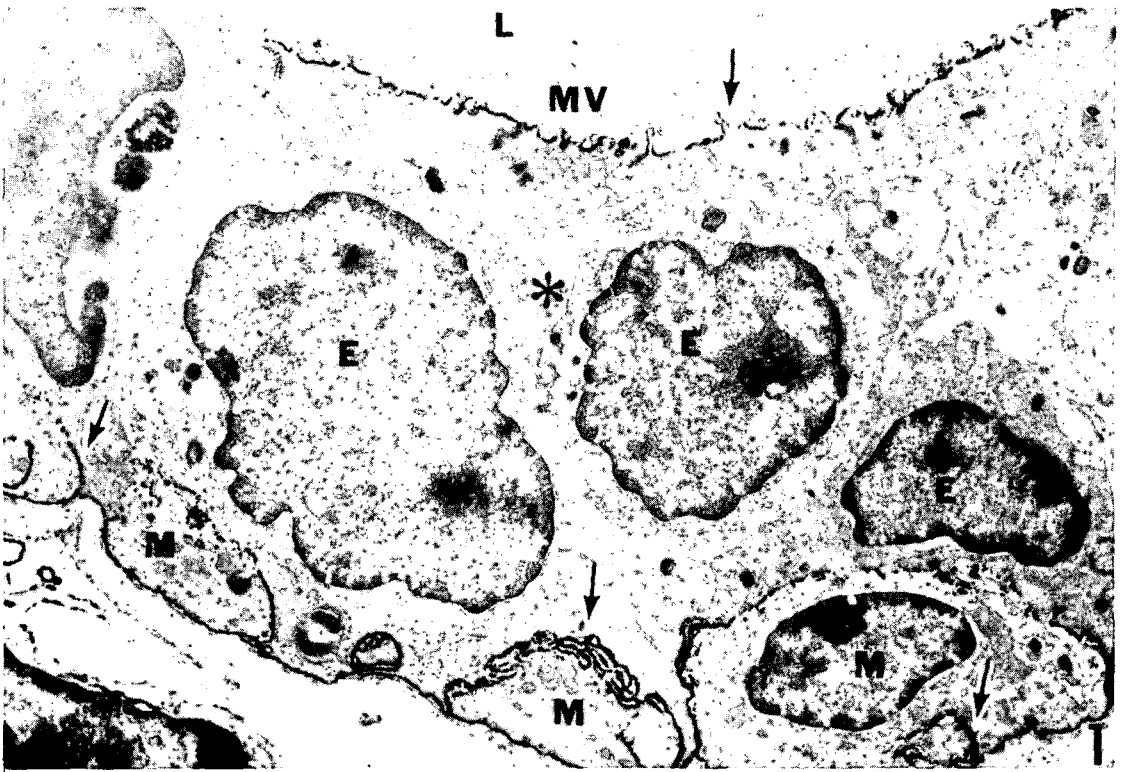
Positive staining for cell surface of compact tissue, Golgi complex, pinocytotic vesicles, and phagocytic vacuoles.

이상과 같이 전자현미경에 의한 효소 및 비효소성 세포화학적 방법은 많은 고분자 물질들의 소재를 확인하는데 큰 도움을 주고 있으며 앞으로 전자현미경 표지법, 자기방사법 및 면역전자현미경법과 더불어 세포 및 조직의 구성과 기능을 연구하는데 필수 불가결한 자리를 차지하게 될 것이라 믿는다.

Reference

- 1) Allen A. K., Nenberger A. and Sharon N.; The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Bioche. J.* 131; 155~162, 1973.
- 2) Barnett S.; The cell surface components and configurations. *Handbook of molecular cytology.* North Holland. 1263~1293, 1969.
- 3) Bernhard W. and S. Avrameas; ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Exp. Cell. Res.* 64; 232~236, 1971.
- 4) Cuatrecasas P.; Interaction of wheat-germ agglutinin and concanavalin A with isolated fat cells. *Biochemistry.* 12; 1312~1323, 1973.
- 5) Gautier A., R. Cogliati, M. Schreyer and J. Fakan; "Feulgen-type" and "PAS-type" reactions. *Electron microscopy and cytochemistry,* 271~274, 1973.
- 6) Gomori G.; *Microscopic histochemistry.* Univ. Chicago press. Chicago. 1952.
- 7) Kim C. S.; *Electron microscopy in Medical*

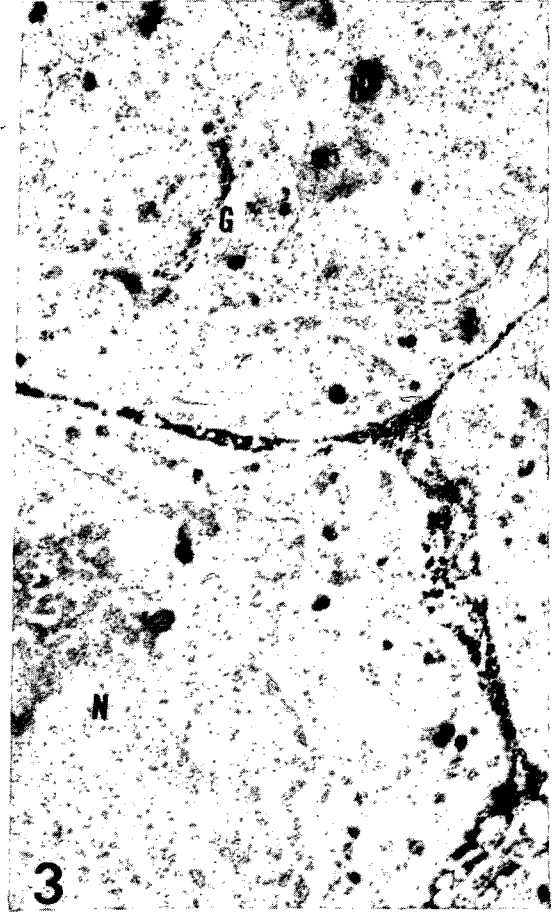
- Science. *J. of RIMSK* 7, 5. 259~269, 1975.
- 8) Kim C. S.; Practical Application of Electron Microscopy in clinical medicine. *Korea E.M.* 8, 1, 81~90, 1978.
 - 9) Luft J. H.; Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red staining *J. cell Biol.* 23; 54 A. 1964.
 - 10) Luft J. H.; Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and myotendinal junction. Electron microscopy. Ed. by R. Ueda Maruzen Co. Tokyo 2;65, 1966.
 - 11) Marinozzi V.; Silver impregnation of ultrathin reactions for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cyto.* 9;121~131, 1961.
 - 12) Marinozzi V.; The role of fixation in electron staining. *J. of Royal Mic. Society* 8, 3;114~154, 1963.
 - 13) Nagara Y. and Burger M. M.; Wheat-germ agglutinin isolation and crystallization. *J. Biol. Chem.* 247;2248~2250, 1972.
 - 14) Novikoff A. B., D.H. Hausman and E. Podber; The localization of adenosine triphosphatase in the liver *in situ* staining and cell fractionation studies, *J. Histochem. Cytoche.* 6;61, 1958.
 - 15) Rothman A. H.; Alcian blue as an electron stain. *Exp. Cell. Res.* 58;177, 1969.
 - 16) Sabatini D. D., K. Bensch and R. J Barnett; Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.* 17;19, 1963.
 - 17) Scott J. E., Quintarelli G. and Dellovo M. C.; Chemical and histochemical properties of alcian blue 1. The mechanism of alcian blue staining. *Histochem.* 4; 73~85, 1964.
 - 18) Swift H.; Cytochemical studies on nuclear fine structure. *Exp. Cell. Res.* 9; 54~67, 1963.
 - 19) Swift J. A. and Saxton C. A.; The ultrastructural localization of the periodic Schiff reactive basement membrane at the dermoepidermal junction of human scalp and monkey gingiva. *J. Ultra. Res.* 17;23~33, 1967.
 - 20) Washstein M. and Meisel E.; On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 4;592, 1956.
 - 21) Watson M.; Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cyto.* 4;475, 1958, a.



Alkaline phosphatase 활성 $\times 7,600$



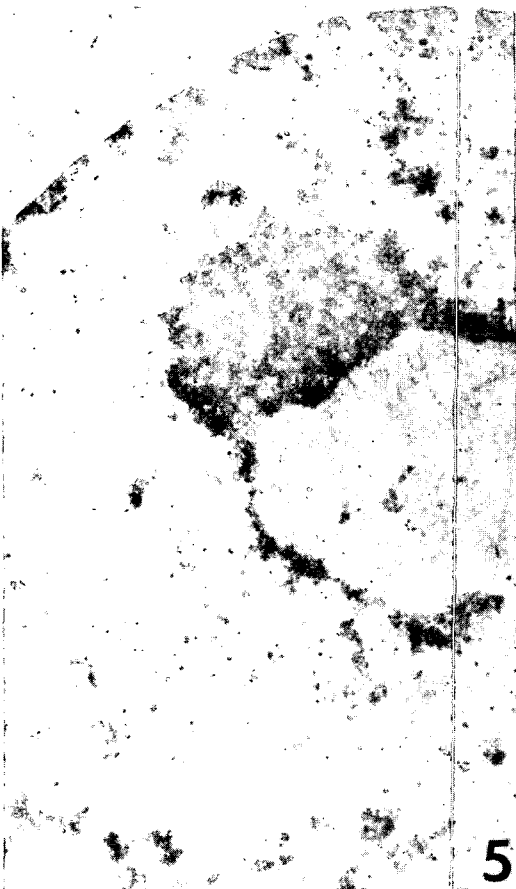
Acid phosphatase 활성 $\times 15,000$



Adenosine-triphosphatase 활성 $\times 10,000$



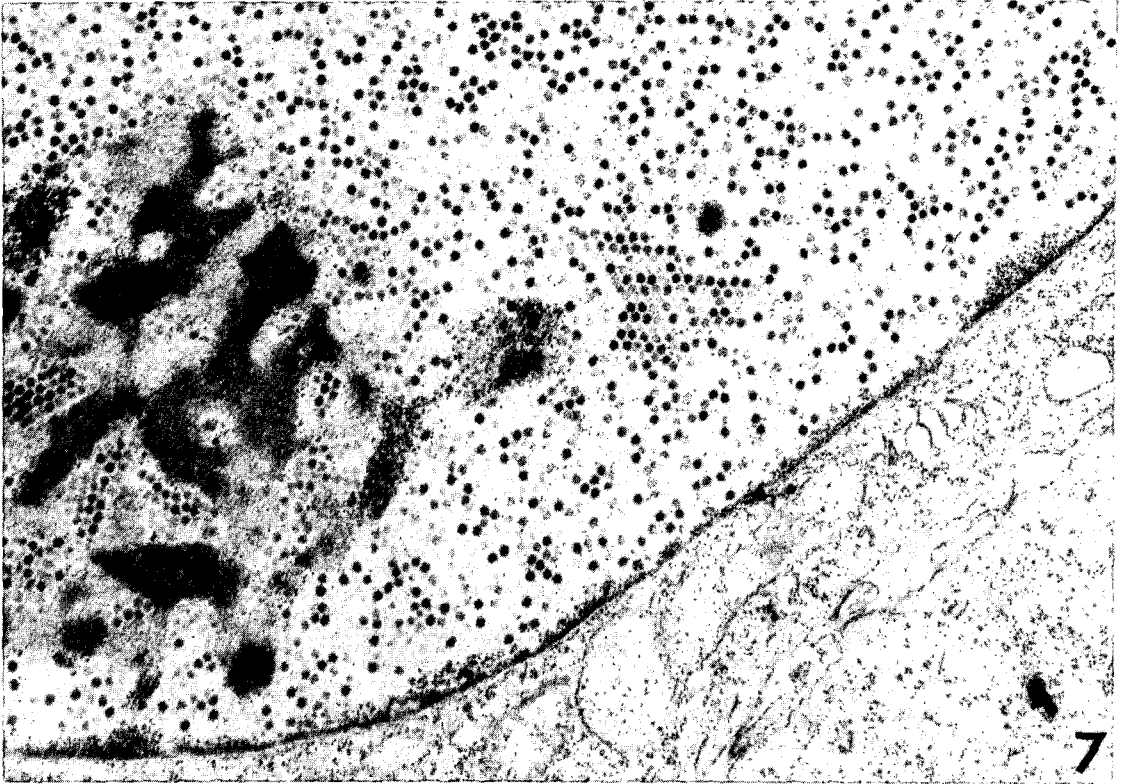
DNase 로 처리된 후의 핵내소견 ×30,000



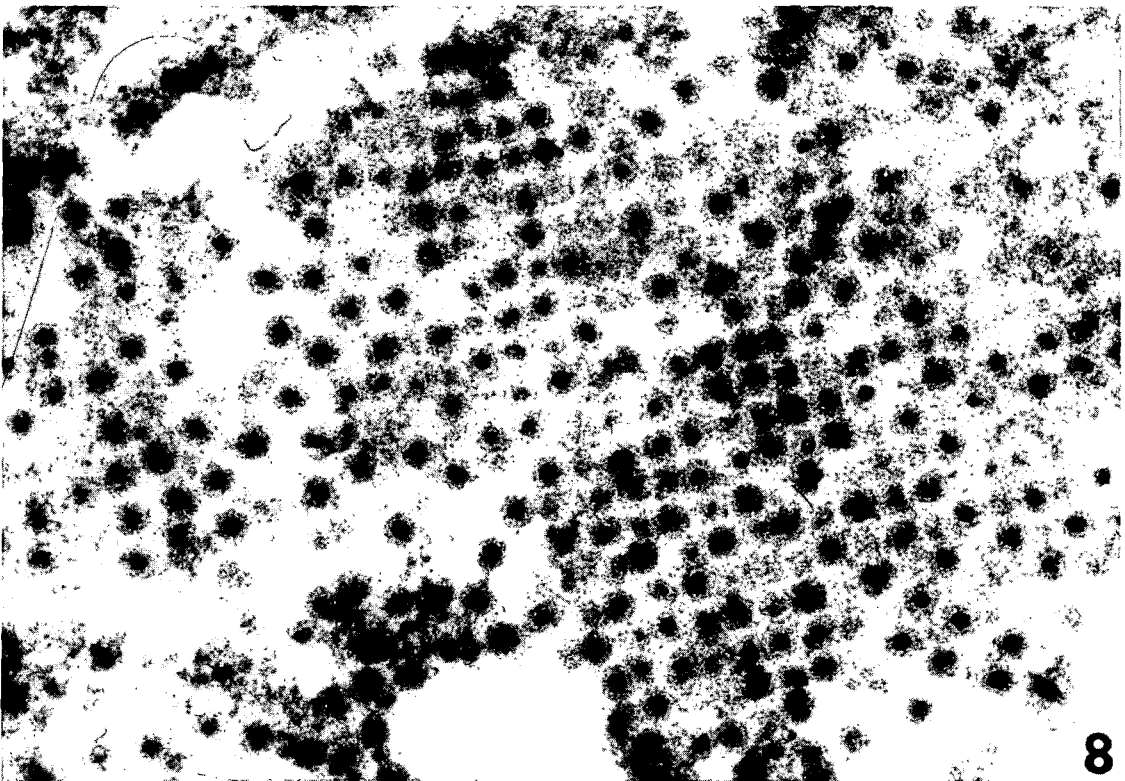
RNase 처리후 핵내소견



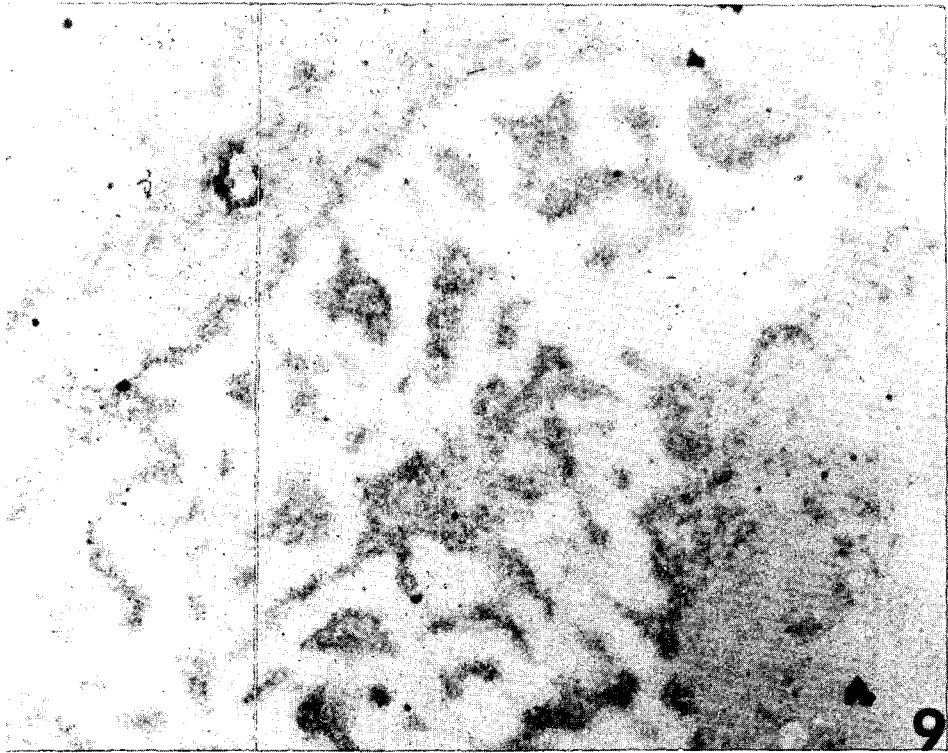
EDPS 로 처리후 나타나는 DNA virus ×40,000



핵내에 침입된 DNA virus, uranyl 및 lead citrate 염색 $\times 22,000$



DNA virus 에 작용한 Feulgen 반응 $\times 40,000$



핵내 작용한 Osmium Amine (OA) 반응 $\times 30,000$



Con A 및 peroxidase 의 반응물 $\times 30,000$