

The Influence of Glutaraldehyde Concentration on Electron Microscopic Multiple Immunostaining

Jae Seok Bae, Eun Jin Yeo, and Yong Chul Bae*

Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 700-412, Korea

(received October 30, 2015; accepted November 24, 2015)

The present study was aimed to evaluate the influence of glutaraldehyde (GA) concentration on multiple electron microscopic (EM) immunostaining using pre-embedding peroxidase and post-embedding immunogold method. Influence of various concentrations of GA included in the fixative on immunoreactivity was assessed in the multiple immunostaining using antisera against anti-transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) for peroxidase staining and anti-GABA for immunogold labeling in the rat trigeminal caudal nucleus. Anti-TRPV1 antiserum had specificity in pre-embedding peroxidase staining when tissues were fixed with fixative containing paraformaldehyde (PFA) alone. Immunoreactivity for TRPV1 was specific in tissues fixed with fixative containing 0.5% GA at both perfusion and postfixation steps, though the immunoreactivity was weaker than in tissues fixed with fixative containing PFA alone. Tissues fixed with fixative containing 0.5% GA at the perfusion and postfixation steps showed specific immunogold staining for GABA. The results of the present study indicate that GA concentration is critical for

immunoreactivity to antigens such as TRPV1 and GABA. This study also suggests that the appropriate GA concentration is 0.5% for multiple immunostaining with peroxidase labeling for TRPV1 and immunogold labeling for GABA.

Key words: fixation, glutaraldehyde concentration, immunoreactivity, multiple immunostaining, electron microscopy

서 론

모든 면역조직화학 반응에서 조직과 세포는 변성이 적은 상태로 보존하는 것이 필수적이며, 이를 위해 고정 (fixation)이라는 조직처리 과정을 수행하게 된다. 면역조직화학반응을 위한 조직의 고정에서 반드시 고려되어야 할 사항은 고정의 원래 목적인 형태(structure)의 보존과 아울러, 면역조직화학 기법을 이용해서 관찰하고자 하는 물질의 항원성(antigenicity)의 보존이다. 고정은 세포의 효소작용에 의한 자가분해를 방지하고 세포 성분이 응고 및 경화하는 것을 최소화하고, 조직 내의 단백질 및 지질과 결합하여 조직을 제 위치에 고정하는 역할을 한다. 면역조직화학반응의 목적은 특정 항원에 대한 반응성을 조직과 세포내에서 확인하는 것이므로, 조직 및 세포의 형태보존은 필수적이다. 그러나 항원성과 형태를 함께 보존하기 위해서는 서로 상반된 점을 보완하여야 할 필요가 있다. 일반적으로 고정으로 인해 항원성이 감소하거나 소실이 일어날 수 있기 때문에 항원성을 고려

*Correspondence to: Yong Chul Bae, Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1, 2-Ga, Samdeok-Dong, Jung-Gu, Daegu 700-412, Korea.
Tel.: +82-53-660-6860, Fax: +82-53-426-7731
E-mail: ycbae@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한다면 약한 고정 즉, 고정액의 농도를 낮추는 것이 좋지만, 형태 보존을 생각한다면 일정 농도 이상의 고정액을 사용할 필요가 있다. 그러나 과다 고정 시에는 세포 내 물질이 유출되거나 물이 들어가는 경우도 발생하여 오히려 형태의 보존이 어려운 경우도 있기 때문에 고정의 과정은 매우 중요한 단계이다.

가장 이상적인 고정액이란 조직의 수축 또는 팽창 등의 변화를 최소화하며 빨리 조직 내에 침투할 수 있는 것이어야 한다. 고정액은 크게 단백질의 응고침전을 기본으로 하는 유기용제계에 의한 고정액과 단백질의 펩티드와 교차결합(cross linkage)을 형성하는 알데히드계(aldehyde) 고정액으로 나눌 수 있다[1,2]. 이들 고정액 중 면역조직화학반응에 주로 사용되는 것은 알데히드계 고정액으로서, 대부분의 경우 파라포름알데히드(paraformaldehyde; PFA)와 글루타알데히드(glutaraldehyde; GA)를 조합한 것을 사용하는 것이 일반적이다. 그러나 글루타알데히드는 조직 내에 침투하여 화학반응을 일으킨 후 free aldehyde group을 형성함으로써 ‘고정으로 인한 비특이적 반응’을 야기시킨다. ‘항원성의 보존이 좋다’는 것은 염색되어야 할 항원이 그 장소에 분명하게 존재하여 염색된 것을 말하는 것이며, 비특이적 반응을 보인다는 것은 항원성의 감소를 의미한다. 따라서 글루타알데히드는 면역반응을 방해하기 때문에 free aldehyde group을 알코올로 바꾸는 sodium borohydride (NaBH₄)를 처리하는 과정을 거치는 것이 일반적이다[3].

전자현미경 관찰을 위해 시편을 제작할 경우에도 형태의 보존을 위해 글루타알데히드 고정액을 사용하는데 [4-9], 이 때 글루타알데히드가 결합된 항 아미노산(GA-conjugated anti-amino acids)과 항 모노아민(GA-conjugated anti-monoamines) 항체를 이용하여 면역염색하는 경우에는 더욱 특이적인 면역반응을 관찰할 수 있다[10,11]. 이와 같이 포매 전에 면역반응을 실시하는 포매 전 면역조직화학기법 (preembedding immunocytochemistry)과 포매 후 면역조직화학기법 중 하나인 금입자 면역염색법 (postembedding immunogold labeling)등에는 형태의 보존성을 높이기 위해 글루타알데히드로 고정을 많이 실시하며, 이 경우 고농도의 글루타알데히드가 함유된 고정액으로 고정할 경우에 특이성 있는 면역반응을 관찰할 수 있다고 알려져 있다[10,11]. 그러나 상당수의 항체는 글루타알데히드를 항원의 한 성분으로서 인식하지 못하는 경우가 많기 때문에, 글루타알데히드에 의해 고정된 조직에서 특이성을 보이지 못하는 경우가 많다. 따라서 글루타알데히드에 의해 고정된 조직에서 글루타알데히드를 항원으로서 인식하지 못하는 항체를 사용하여 포매 전 면역염색법을 시행하고, 또한 글루타알데히드를 항원으로 인식하는 항

체를 사용하여 포매 후 면역염색법을 함께 시행하고자 할 경우엔 조직의 구조적 보존성과 항체 특이성을 동시에 만족시키는 고정 조건 즉 글루타알데히드의 적정 농도를 찾는 게 중요하다.

이 연구에서는 포매 전 면역조직화학기법[12-14]과 포매 후 면역조직화학 기법인 금입자 면역염색[15]을 함께 시행하는 경우에 글루타알데히드의 농도 및 침투시간이 면역조직화학 반응의 특이성에 미치는 영향과 최적의 면역반응을 유도할 수 있는 조건을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

포매 전 peroxidase 면역 반응 및 전자현미경 검색을 위한 시편제작

본 실험에서는 체중 약 350 g의 흰쥐 5마리를 사용하였다. 흰쥐 3마리를 관류고정한 후, 약 1시간 30분 동안 4% 파라포름알데히드가 함유된 고정액(in 0.1 M phosphate buffer; 0.1 M PB, pH 7.4, 4°C)에서 고정하였다. 이후 진동절편기를 이용하여 60 μm 두께의 연속절편을 만들어 0%, 0.01%, 0.1%, 0.5% 글루타알데히드를 함유하는 고정액에 각각 30분간 재고정 하였다. 또한 흰쥐 2마리를 0.5% 글루타알데히드가 함유된 4% 파라포름알데히드 고정액에 관류고정한 후, 조직을 적출한 다음 동일한 방법으로, 진동절편기로 연속절편을 만들고 0.5% 글루타알데히드를 함유하는 고정액에서 1시간 재고정 하였다.

각 절편을 0.1 M PB로 여러 번 세척한 후, 동결방지를 위하여 30% sucrose (in 0.1 M PB, pH 7.4)용액에 넣어 4°C에서 하루 동안 침적시켰다. 다음날, 항체의 조직 내 침투를 용이하게 하기 위하여 절편을 드라이아이스에서 20분간 동결시킨 후, 0.01 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)에서 신속히 해동하였다. 조직내 글루타알데히드를 제거하기 위해 1% NaBH₄용액에서 30분간 반응시키고, 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 10분간 반응시켰다. 그 후 10% NDS (normal donkey serum, in 0.01 M PBS)에서 30분간 반응시킨 다음, 일차항체(goat anti-TRPV1 antibody, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)에서 실온에서 각각 10시간 반응시켰다.

다음날 이차항체(biotin conjugated donkey anti-goat antibody, 1:200, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA)에 실온에서 2시간 반응시킨 다음, 0.01 M PBS로 3회 세척하고, ExtrAvidin peroxidase (1:5000, Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 1시간 동안 반응하였다. 이후 0.1 M PB로 세척하고,

nikel-intensified 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색 반응을 하였다. 이후 0.1 M PB로 여러 번 세척한 후, 0.5% osmium tetroxide (in 0.1 M PB, pH 7.4) 에서 30분 동안 후고정을 시행하였다. 탈수는 계열 에탄올로, 침투는 propylene oxide로 하였으며, 절편을 두 장의 Aclar plastic (EMS) 사이에 넣어 Durcupan ACM (Fluka, Switzerland)으로 포매하여 59°C에서 48시간 동안 경화하였다.

포매한 절편은 순간접착제를 이용하여 공 block위에 붙인 후, 일부 절편은 연속 초박절편으로 잘라서 formvar film 지지막을 형성한 단공 grid위에 얹어 전자현미경용 시편을 제작하였다.

포매 후 금입자 면역염색 및 전자현미경적 분석

포매한 절편을 순간접착제를 이용하여 공 block위에 붙인 후 일부 절편은 연속 초박절편으로 잘라서 formvar film 지지막을 형성한 단공 grid위에 얹어 포매 후 금입자 면역염색을 시행하였다. 1% periodic acid 용액으로 7분 동안 resin을 etching한 후, 9% sodium-m-periodate 용액으로 osmium을 제거하였다. 이후, 1% sodium borohydride로 10분간 반응시켜 aldehyde group을 환원시켰다. 2% human serum albumin으로 10분 동안 전배양한 후 1:700으로 희석한 rabbit anti-GABA serum (conjugated to glutaraldehyde; 1:700, Chemicon, Temecula, CA, USA) 용액에 각각 연속절편을 함유한 grid를 두어 실온에서 3시간 40분 동안 반응한 다음 이차항체(goat anti-rabbit IgG coupled to colloidal gold particles of 15 nm dia., 1:20, Biocell Co, Cardiff, UK)에 2시간 반응시켰다. 그 후 uranyl acetate 포화용액 및 0.3% lead citrate 용액으로 염색하여 투과전자현미경(Hitachi H-7500)으로 관찰하였다.

결 과

포매 전 peroxidase 면역반응을 실시하고, 포매 후 금입자 면역염색법을 시행한 다음, 조직을 전자현미경으로 검경함으로써 고정이 다중 면역염색에 미치는 영향을 분석하였다. 포매 전 DAB 면역염색의 경우, 글루타알데히드를 함유한 고정액이 면역염색에 미치는 영향을 확인하기 위해 글루타알데히드 농도 및 침투시간에 따라 실험군을 나누어 관찰하였다. 즉, 글루타알데히드를 함유하지 않은 4% 파라포름알데히드 고정액으로 관류고정한 후 면역염색을 시행한 군과 0.5% 글루타알데히드가 함유된 고정액으로 관류고정을 실시한 다음 면역염색을 시행한 군으로 나누고, 각 군의 시편을 따로 제작하여 DAB 면역반응을 시행하여 면역양상을 관찰하였다.

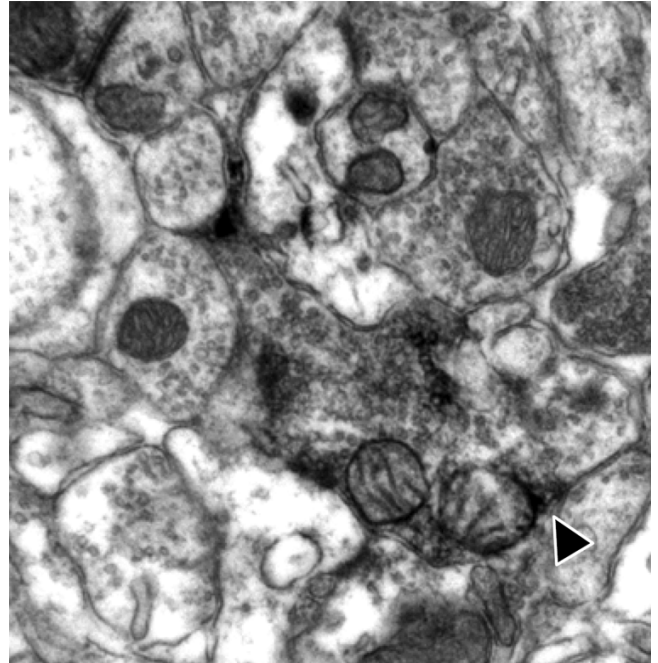


Fig. 1. Electron micrographs showing TRPV1 immunostaining by using preembedding electron microscopic peroxidase immunostaining in the trigeminal caudal nucleus. Electron micrographs showing TRPV1+ immunoreactivity following application of 0.01% glutaraldehyde (GA; A), 0.1% GA (B), 0.5% GA (C) in fixative at postfixation step after perfusion with fixative containing 4% paraformaldehyde (PFA) only. Peroxidase immunoreaction for TRPV1 after perfusion with fixative containing 4% PFA and 0.5% GA (D). The higher GA concentration is, the weaker the immunoreactivity is. Arrowheads indicate electron-dense immunoreaction product of TRPV1. Scale bars = 500 nm.

글루타알데히드를 함유하지 않은 4% 파라포름알데히드 고정액으로 관류고정 후 다양한 농도의 글루타알데히드(0.01%, 0.1%, 0.5%)를 함유한 고정액으로 후고정한 경우를 각각 관찰한 결과, peroxidase 면역반응의 전반적인 양상은 글루타알데히드의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 즉, 항 TRPV1 항체를 사용하여 포매 전 peroxidase 면역반응을 시행한 경우엔, 발색된 반응산물이 관찰되는 빈도가 글루타알데히드가 포함되지 않는 고정액을 사용하였을 경우에 비해 글루타알데히드가 함유된 고정액을 사용한 경우에서 감소하는 경향을 보인 반면 (Fig. 1A-C), 관류고정 시 0.5% 글루타알데히드가 함유된 고정액을 사용한 경우에는 peroxidase 반응산물이 관찰되는 빈도가 상대적으로 현저하게 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 1D). 다시 말해서, 고정액에 함유된 글루타알데히드의 농도 및 침투시간에 따라 peroxidase 면역반응의 산물이 관찰되는 빈도가 감소하는 경향성을 보였다 (Table 1).

포매 전 면역조직화학 기법으로서 peroxidase 면역염

Table 1. Immunoreaction according to glutaraldehyde concentrations or penetration times

GA concentration in fixative for perfusion	GA concentration in fixative for postfixation	Immunoreaction	
		DAB staining for TRPV1 receptor	Immunogold labeling for GABA
0% GA / 4% PFA	0.01% GA	(+++)	(-)
	0.1% GA	(++)	(-)
	0.5% GA	(++)	(-)
0.5% GA / 4% PFA	0.5% GA	(+)	(+)

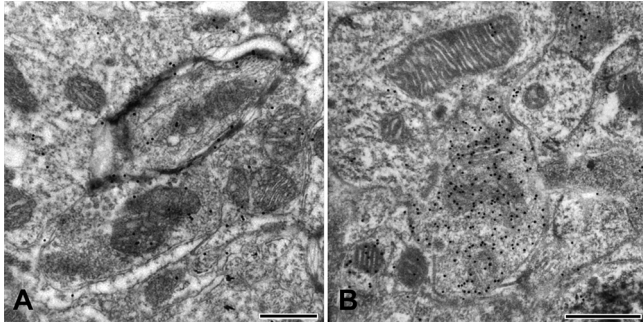


Fig. 2. Electron micrographs showing GABA immunoreactivity in postembedding immunogold staining in the trigeminal caudal nucleus. The degree of immunogold labeling varies according to the time point of glutaraldehyde (GA) application and penetration of glutaraldehyde into the tissue. GABA immunoreactivity is predominantly weak when tissue is postfixed with fixative containing 0.5% GA after perfusion with fixative containing 4% paraformaldehyde (PFA) only (A). A bouton shows high density of gold particles for GABA after perfusion with fixative containing 4% PFA and 0.5% GA (B). Scale bars = 500 nm.

색을 시행한 후, 글루타알데히드에 결합된 GABA를 인식하는 항 GABA 항체를 사용하여 포매 후 금입자 면역염색법을 시행한 경우에, 초기 고정단계인 관류고정시 글루타알데히드의 함유 여부에 따라 두 군으로 나누어 금입자 면역염색양상을 관찰하였다(Table 1): 글루타알데히드가 함유되어 있지 않는 4% 파라포름알데히드 고정액으로 관류고정한 다음, 0.01% ~ 0.5% 글루타알데히드를 함유한 고정액으로 후고정한 경우에는 특이성 있는 금입자 면역염색이 나타나지 않았다(Fig 2A). 그러나 관류고정시에 0.5% 글루타알데히드가 함유된 고정액을 사용한 경우에는 특이성 있는 면역양성반응이 관찰되었다(Fig. 2B).

고 찰

본 연구에서는 글루타알데히드가 면역조직화학기법에 미치는 영향을 분석하고자 하였으며, 특히 포매 전

peroxidase 염색법과 금입자면역염색법에 상업적으로 시판되는 항체들을 동시에 적용하여 특이성이 있는 면역반응 결과를 얻기 위한 최적의 글루타알데히드 농도와 침투 시점을 파악하고자 하였다. 이를 위해 글루타알데히드를 인식하지 못하는 TRPV1 항체와 글루타알데히드 인식능을 가진 GABA 항체를 대표적으로 사용함으로써 글루타알데히드의 농도 및 침투시기에 따라 그 면역반응양상의 변화를 관찰하였고, 이와 같은 다중염색 시료의 전자현미경 관찰을 위한 적절한 고정 조건을 찾고자 하였다.

본 실험의 주된 연구결과로서, TRPV1에 대한 peroxidase 면역반응에서는 글루타알데히드의 농도가 높을수록 면역반응이 감소하는 경향성이 확인되었다(Table 1). 하지만 글루타알데히드 농도가 증가할수록 금입자면역염색법을 통한 면역반응이 특이적으로 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서 금입자면역염색에서는 초기 고정단계인 관류고정시의 글루타알데히드 농도가 면역반응에 크게 영향을 미쳤음을 알 수 있다. 이처럼 글루타알데히드의 농도가 증가할수록 peroxidase 면역반응성이 감소하는 경향성이 나타나는 이유는 글루타알데히드가 조직 내에 침투하여 화학반응을 일으킨 다음 비특이적 반응을 일으키는 free aldehyde group을 형성하기 때문일 것으로 생각된다. 알데히드계 고정액은 알데히드기와 유리아미노기가 교차결합을 하여 형태를 보존하는 역할을 하게 되는데, 파라포름알데히드의 경우는 알데히드기가 1개이고 글루타알데히드의 경우는 알데히드기가 2개이다. 따라서 초기에 파라포름알데히드로 관류고정한 후 글루타알데히드로 후고정하는 것은 확률적으로 글루타알데히드와 결합하는 면적이 줄어들다고 볼 수 있다. 반면, 0.5% 글루타알데히드를 함유한 고정액으로 관류고정한 경우는 초기고정 단계에서 조직이 글루타알데히드에 노출되는 면적이 많아질 것이라는 것을 의미하는 것으로 글루타알데히드의 농도를 높이는 것과 같은 효과라고 생각할 수 있다. 따라서 글루타알데히드를 항원으로서 인식하지 못하는 TRPV1 항체의 경우엔 글루타알데히드 농도가 낮을수록 그리고 관류고정시 글루타알데히드가 포함되지 않을수록 특이성이 높은 면역염색 결과를 얻을 수 있었을 것

이라고 판단된다.

그러나 포매 후 금입자 면역염색에서 사용한 항GABA 항체는 글루타알데히드를 항원의 일부로서 인식하는 항체로서 고농도의 글루타알데히드를 함유한 고정액을 사용한 경우에 가장 반응성이 좋다고 알려져 있다. 그러므로 이와 같은 항GABA 항체를 사용한 포매 후 금입자면역반응의 경우에는 peroxidase 면역반응과는 달리 고농도의 글루타알데히드가 효율적으로 조직내에 침투될수록 우수한 연구결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며, 따라서 관류고정시 파라포름알데히드와 함께 글루타알데히드를 포함시켜 고정하는 것이 가장 효과적이라고 볼 수 있다.

하지만 이와 같이, 글루타알데히드에 대해 서로 다른 반응양상을 보이는 항체들을 사용하여 각각 peroxidase 면역반응과 금입자 면역반응을 동일 조직에 포매 전, 후 각각 실시하여 관찰하고자 한다면, 글루타알데히드에 대한 반응이 서로 반대인 항체의 특성에 비추어 볼 때, 관류고정시에는 0.5% 글루타알데히드를 첨가한 고정액을 사용하는 것이 가장 좋은 조건이며, 더불어 후고정시에도 0.5% 글루타알데히드를 함유한 고정액에서 반응시킴으로써 글루타알데히드에 대해 취약한 항TRPV1 항체에 대한 반응성은 일부 양보하고 글루타알데히드 고정에 대해 호의적인 항GABA 항체에 대한 반응성을 최소한으로 부여할 수 있는 것으로 나타났다.

따라서 이 연구를 통해, 포매 전 면역조직화학법과 포매 후 금입자면역염색법 등과 같은 다중적 면역염색을 할 경우, 특히 글루타알데히드에 대해 서로 다른 반응을 보이는 항체를 사용하는 면역반응에는 관류고정 및 후고정 단계에서 0.5% 글루타알데히드를 사용하는 것이 가장 이상적임을 파악할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비와 2008년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2008-0062282).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Berod A, Hartman BK, Pujol JF. Important of fixation in

- immunohistochemistry: Use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:844-850
2. Perase AGE. *Histochemistry.* Vol.1, Churchill Livingstone: Edinburgh; 1968.
 3. Kosaka T, Nagatsu I, Wu JY, Hama K. Use of high concentrations of glutaraldehyde for immunocytochemistry of transmitter-synthesizing enzymes in the central nervous system. *Neuroscience.* 1986;18:975-990.
 4. Ribeiro-da-Silva A, Yuste R, Cuello AC. Distribution of neurokinin immunoreactive fibres in the skin of the lower lip: A light and electron microscopic study in rat. *Regul Pept.* 1988;22:158.
 5. Ribeiro-da-Silva A, Pioro EP, Cuello AC. Substance P- and enkephalin-like immunoreactivities are colocalized in certain neurons of the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. An ultrastructural double-labelling study. *J Neurosci.* 1989;11:1068-1080.
 6. Ribeiro-da-Silva A, Tagari P, Cuello AC. Morphological characterization of substance P-like immunoreactive glomeruli in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord and trigeminal subnucleus caudalis: A quantitative study. *J Comp Neurol.* 1989;281:497-515.
 7. Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. Ultrastructural evidence for the occurrence of two distinct somatostatin-containing systems in the substantia gelatinosa of rat spinal cord. *J Chem Neuroanat.* 1990;3:141-153.
 8. Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. Choline acetyltransferase-immunoreactive profiles are presynaptic to primary sensory fibers in the rat superficial dorsal horn. *J Comp Neurol.* 1990;295:370-384.
 9. Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. Co-localization of substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities in the rat dorsal horn. An ultrastructural double-labelling study. *Abstr IBRO Third World Congr. Neurosci.* 1991;195
 10. Marlier L, Sandillon F, Poulat P, Rajaofetra N, Geffard M, Privat A. Serotonergic innervation of the dorsal horn of rat spinal cord: Light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Neurocytol.* 1991;20:310-322.
 11. Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol.* 1984;229:374-392.
 12. Pickel VM. Immunocytochemical methods. In: Heimer L., Robards MJ, editors. *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods.* New York: Plenum Press 1981. p. 483-509.
 13. Priestley JV, Alvarez FJ, Averill S. Pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry. In: Polak JM, Priestley JV, editors. *Electron Microscopic Immunocytochemistry: Principles and Practice.* London: Oxford Univ. Press; 1992. p. 89-121.
 14. Ribak CE, Vaughn JE, Barber RP. Immunocytochemical localization of GABAergic neurons at the electron microscopic level. *Histochem.* 1981;13:555-582.
 15. Faulk WP, Talyor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry.* 1971;8:1081-1083.