

종양원성 바이러스 인지를 위한 전자현미경적 *In Situ* Hybridization 방법에 관한 연구

조선대학교 의과대학 병리학교실 및 약리학교실*

기 근 흥 · 최 철 희* · 전 호 중

Ultrastructural *In Situ* Hybridization Method for Detection of Oncogenic Viruses

Keunhong Kee, M.D., Chulhee Choi, M.D.* and Hojong Jeon, M.D.

Department of Pathology and Pharmacology*, Chosun University Medical College

In situ hybridization (ISH) is a standard method for localizing DNA or RNA sequences in tissue or cell preparation. The technique was developed at the electron-microscopic level, and enables the precise subcellular localization. A method was developed for detection of specific viral DNA. We have tested various methods and technique to detect specific viral DNA through ISH at the electron microscopic level. Postembedding method of ultrastructural ISH was developed and successfully applied for the detection of human papillomavirus type 16 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix and Epstein-Barr virus in EBV-infected leukemia cell line. The following results are made. The best results were obtained using 0.2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde fixed tissue or cell block. The labelling was best observed on Unicryl resin and Lowicryl K4M resin sections. Epon sections showed no reactivity. Thin sections of Unicryl resin were more easier than Lowicryl K4M resin. Enzymatic predigestion with proteinase K, pepsin and trypsin gave good results. However, high concentration of these produce poor results due to excessive destruction of the cellular components. Alkali treatment with 0.5N sodium hydroxide produced successful results in denaturation of target DNA. The labelling density of gold particles was independent of incubation time or temperature in hybridization step. The viral DNA labelling was localized mainly within the nucleus, both within and at the edge of electron dense regions, and below the nuclear membrane. And the labelling was seen in the form of a dense, roughly spherical shape. In conclusion, the best results are obtained by the conditions that tissue fixed by 0.2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde solution, embedded with Unicryl resin, protein denaturation by 0.1ul/ml proteinase K, DNA denaturation by 0.5N sodium hydroxide, and reaction with DNA probe. (Korean J Pathol 1996; 30: 687~698)

Key Words: Ultrastructure, *In situ* hybridization, Method

접 수 : 1996년 1월 4일, 게재승인 : 1996년 4월 1일
주 소 : 광주광역시 동구 서석동 588번지, 우편번호 501-140
조선대학교 부속병원 해부병리과, 기근흥

*이 논문은 1995년도 조선대학교 학술 연구비 지원 및 우수 연구센터 기자재 활용에 의해 연구 되었음.

서 론

최근 분자생물학적 수기가 발달하고 이를 이용한 *in situ* hybridization (이하 ISH로 약기함)이 광학현미경 수준에서 도입되어 진단병리학이나 세포발생학 분야, 또는 virus학 등 광범위하게 응용되고 있다^{1,2}. 이러한 ISH는 전자현미경적 수준에서도 시행되어 세포의 초미세형태적 관찰과 세포질이나 핵내 특이 DNA나 RNA의 국지화가 가능해졌다³⁻¹⁴. 지금까지 보고된 대부분의 전자현미경적 ISH는 조직을 포매하기전에 ISH를 시행하고 포매 후 절편을 제작하여 관찰하는 포매전 방법(pre-embedding method)이 이용되고 있으나^{3,8-10}, 이 방법은 여러가지 단점을 가지고 있다. 그러므로 최근에는 조직을 고정하고 포매하여 절편을 제작한 후 ISH를 시행하는 포매후 방법(post-embedding method)이 시도되고 있다. 그러나 이 방법도 조직을 채취하여 고정하는 과정에서 고정액의 선택, 포매제의 선택, 절편 제작과정, ISH에 이용되는 각종 시약의 선택 등에 따라 그 결과에 많은 차이가 나타난다고 한다¹⁴. 그러므로 각기 연구자의 실험실 사정에 맞는 가장 좋은 전자현미경적 ISH를 개발함으로써 좋은 연구 결과를 얻을 수 있을 것으로 여겨진다.

이에 저자들은 면역조직화학적 및 면역전자현미경적 염색과 광학현미경적 ISH 또는 polymerase chain reaction(PCR)을 시행하여 human papillomavirus (HPV)의 감염이 확인된 자궁경부암 조직과 Epstein Barr virus (EBV) 감염이 확인된 세포주를 이용하여 조직 고정액, 각종 포매제, 절편제작용 nickel grid의 전처리, 효소처리 방법, DNA 변성 방법 등을 다양하게 시행하여 그 연구 결과를 비교하고 가장 좋은 조건을 찾아 이를 병리학적 진단에 응용하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

재료는 조선대학교 부속병원에서 절제된 자궁경부 조직중 편평세포암종으로 진단되고, 면역조직화학적 및 면역전자현미경적 염색, 광학현미경적 ISH, PCR을 시행하여 HPV 제 16형의 감염이 확인된 예 중 전자현미경적 ISH가 가능한 3예를 선택하였고, 악성림프종과 백혈병 환자의 혈액을 배양하여 얻은 세포주에서 면역조직화학적 및 면역전자현미경적

염색, 광학현미경적 ISH, PCR을 시행하여 EBV가 검출된 3예를 선택하였다.

면역조직화학적 염색은 universal labelled streptavidin-biotin (LSAB) kit (Dako Co.)를 이용하였으며, 일차항체는 항 HPV capsid 항체(BioGenex Co.)와 항 EBV-EBNA2 항체(Dako Co.)를 사용하였고 발색은 amino-9-ethylcarbazole (AEC)을 사용하였다. 면역전자현미경적 염색 및 전자현미경적 ISH에 사용된 Lowicryl K4M은 EM science, 그리고 Unicryl은 Bio Cell International사 제품을, immunogold conjugated EM protein A는 직경 15 nm의 Bio Cell International사 제품을, HPV DNA 탐색자와 EBV 탐색자는 각각 Oncor사와 Dako사 제품을, 그리고 효소처리에 사용된 proteinase K와, trypsin은 Dako사 제품을 사용하였다.

2. 연구방법

1) 조직표본 준비: 적출된 자궁경부 종양 조직을 1 mm³ 크기로 잘라서 고정액에 담그거나, 배양된 세포주를 5분간 1,000 RPM으로 원심분리하여 PBS로 세척하고 세포 block을 만든 다음 각각 고정액에 담구었다. 고정액은 2% glutaraldehyde와 0.2% glutaraldehyde로 각각 4°C에서 2시간 전고정하고 4% paraformaldehyde로 4°C에서 24시간 후고정한 후 cacodylate 완충액으로 세척하였다. 그리고 1% ammonium chloride로 20분간 반응시켜 aldehyde기를 억제시키고 2% uranyl acetate로 block 염색을 실시하였다. 그후 계열 알코올로 탈수하고 각종 포매제로 포매하였다. 포매제는 Epon 혼합액, Unicryl resin, Lowicryl K4M resin을 사용하였다. Epon에 포매된 조직은 60°C에서 3일간 열중합하였으며, Unicryl resin에 포매된 조직은 4°C에서 48시간, 실온에서 24시간, Lowicryl K4M에 포매된 조직은 -20°C에서 48시간, 실온에서 24시간 각각 자외선 lamp에 노출시켜 중합하였다. 이를 초박절기로 1 μm의 두께로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 특정부위를 정하고, 삭정한 뒤 80 nm의 초박절편을 만들었다. Grid는 120 hole의 nickel grid를 사용하였으며 무처리 grid를 이용하거나 polyvinyl formal powder를 0.3% chlorform 용액에 혼합하여 만든 막으로 피막하고 carbon으로 coating하여 사용하였다.

2) *In situ* hybridization: 조직내 단백을 제거하기 위하여 단백분해 효소를 처리하였다. proteinase K는 10 mM Tris-base (pH 8)와 50 mM EDTA (pH 8)로 1 μg/ml와 100 μg/ml이 되게 희석하였으며, trypsin은 0.1% CaCl₂ (pH 7.8)에 1 μg/ml와 100 μg/ml로 희석하여 반응시켰다. 반응은 습상자에서 점적하고 37°C

에서 15분간 시켰다. 반응후 단백질효소들의 활동을 저지시키기 위하여 4% paraformaldehyde가 포함된 PBS로 3분씩 3회 세척하였다.

조직의 DNA를 변성시키기 위해 70% formamide와 standard saline citrate (SSC)용액의 혼합액에는 Katsumata등¹⁵의 실험에 준하여 10분간 72°C에서, 0.5 N sodium hydroxide에는 Pubion-Dutilleul등¹³의 실험에 준하여 4분간 실온에서, 0.5 N sodium hydroxide와 SSC 혼합액에는 Hutchison등³의 실험에 준하여 2분

간 실온에서 각각 반응시키고 증류수로 5분씩 5회 세척하여 알코올로 탈수한 후 공기중에서 건조시켰다.

Hybridization은 제 16형 HPV DNA 탐색자와 EBV (EBER) DNA 탐색자를 탐색자 cocktail (50% formamide, 2×SSC, 10% dextran sulfate, 0.25% herring sperm DNA)에 2.5 μl/ml이 되도록 혼합하여 반응시켰다. 반응은 37°C에서 1시간과 24시간, 41°C에서 1시간과 24시간씩 반응시켰다.

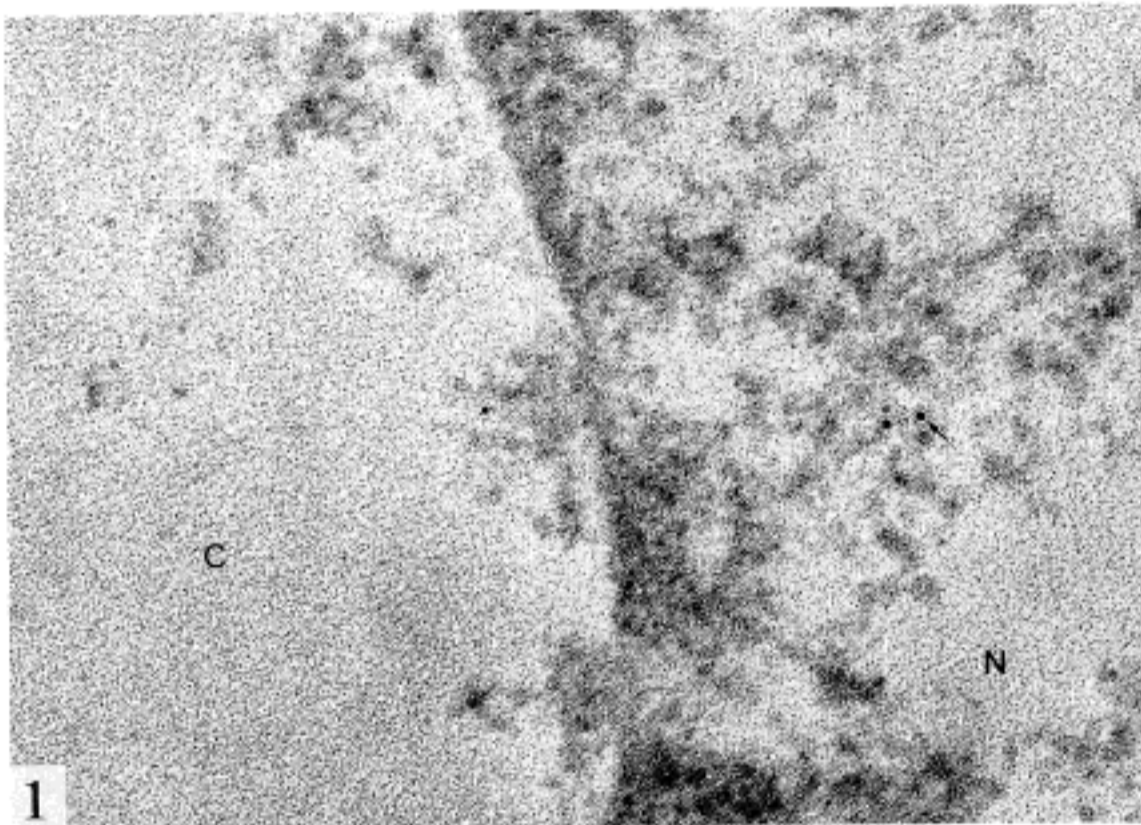


Fig. 1. 2% glutaraldehyde-fixed specimen. Few gold particles (arrow) are noted within the nucleoplasm of the HPV infected uterine cervix. C:cytoplasm, N: nucleus, × 115,600

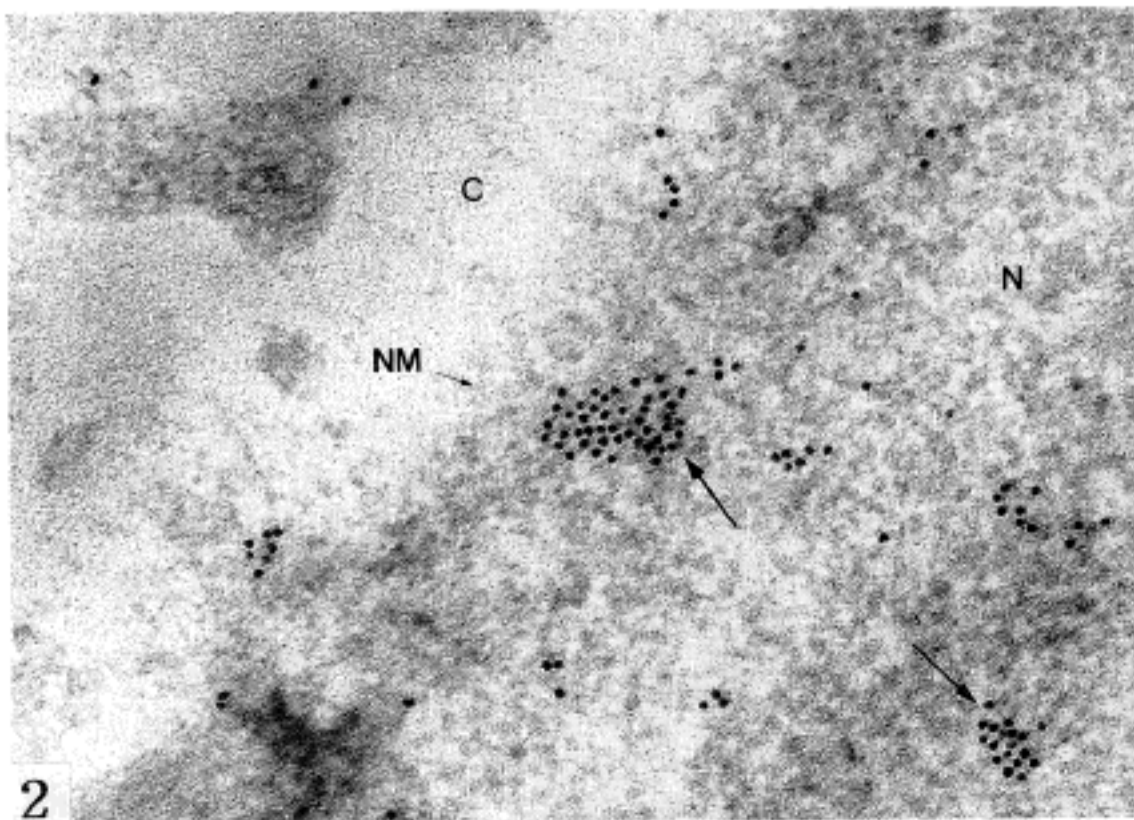


Fig. 2. 0.2% glutaraldehyde-fixed specimen. Many positive gold particles (arrows) are noted in HPV infected uterine cervix, but preservation of cellular architectures are poor. C: cytoplasm, N: nucleus, NM: nuclear membrane, × 96,500

Hybridization 후 여분의 탐색자를 제거하기 위하여 PBS로 5분씩 5회 세척하고, 배경 염색을 줄이기 위하여 10% 정상 염소혈청을 실온에서 15분간 반응시키거나, PBS에 2% 탈지유를 혼합하여 만든 용액으로 실온에서 15분간 반응시켰다. 그리고 반응후 증류수로 5분씩 5회 수세하였다.

탐색자를 인지하는 방법은 직경 15nm의 immunogold conjugated EM protein A 를 1% BSA/PBS에 0.01% Tween 20이 혼합된 용액에 1:50으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 PBS로 5분씩 5회 세척하고 다시 0.1M cacodylate 완충액으로 5분씩

5회 세척한 후 황금과립을 고정하기 위하여 2% glutaraldehyde로 10분간 반응시켰다. 다시 0.1M cacodylate 완충액으로 5분씩 5회 세척하고 uranyl acetate에 7분간, lead citrate에 1분간씩 이중염색을 하였으며 증류수로 5분씩 5회 세척하고, 투과 전자현미경(JEM-100 CX II, JEOL)으로 가속전압 80KV 하에서 관찰하였다. 음성대조 표본은 탐색자의 hybridization 단계에서 탐색자를 첨가하지 않고 반응시킨 표본을 사용하였다.

고정액 선택에 따른 결과의 차이를 보면 고농도의 2% glutaraldehyde를 사용하면 세포의 형태를 관

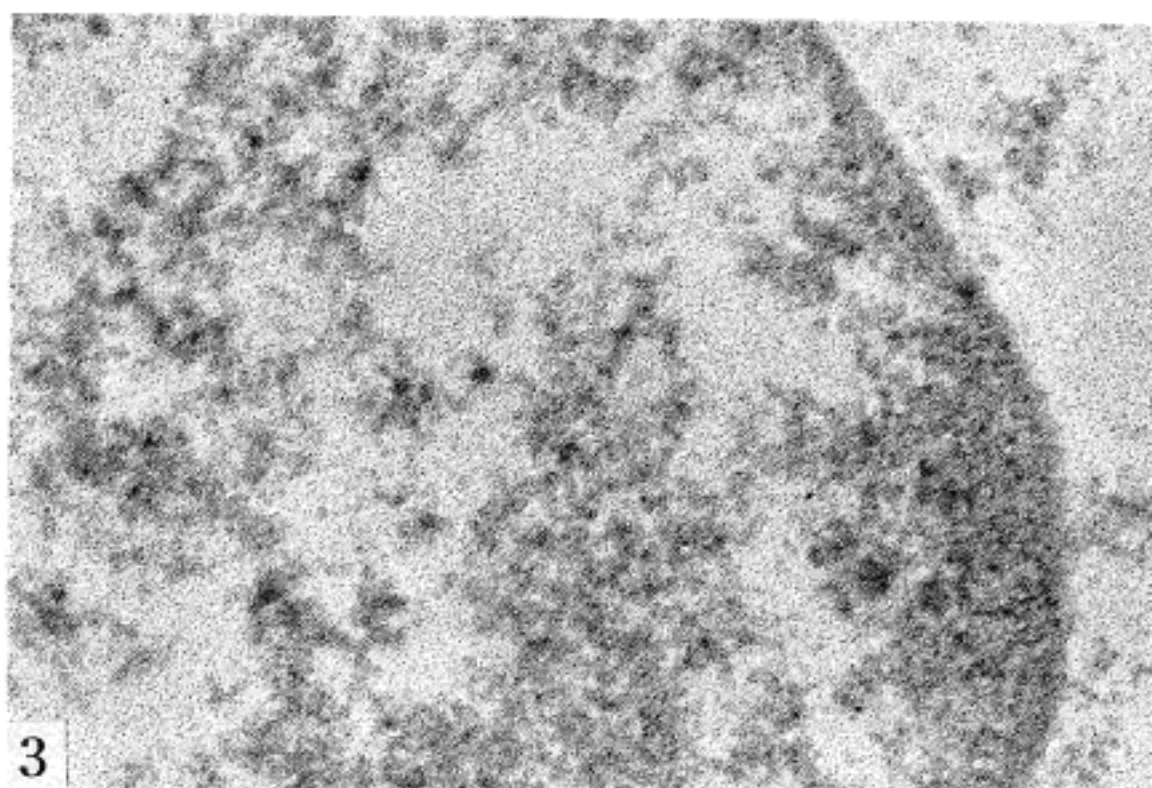


Fig. 3. Negative results are obtained in section of epon-embedded tissue. $\times 91,300$

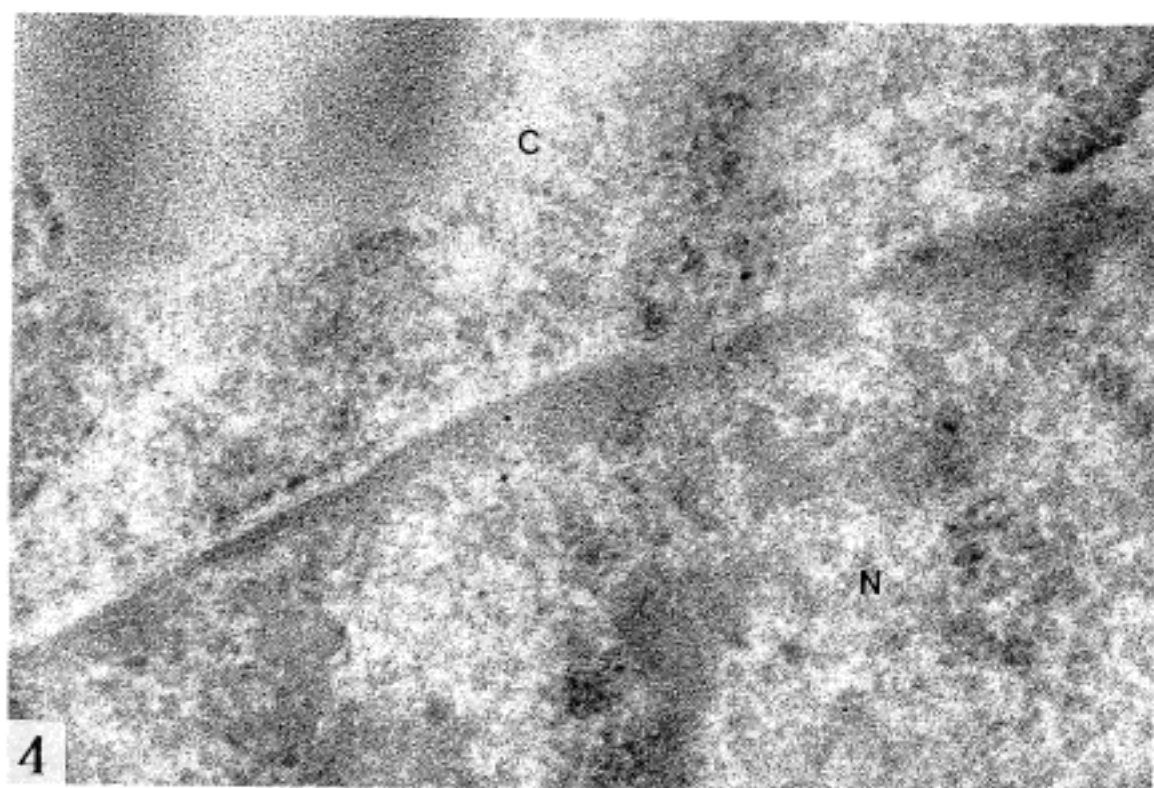


Fig. 4. Chattering phenomenon is noted in Lowicryl K4M-embedded block. $\times 67,200$

찰하기 용이하였으나, 부착된 황금 과립의 수가 적어 80,000배 정도의 고배율상에서도 인지하기 어려웠다(Fig. 1). 반대로 농도를 0.2% glutaraldehyde를 사용하면 세포의 형태는 윤곽만을 관찰할 수 있었으나 핵의 보존 상태는 양호하였으며 20,000배 정도의 저배율상에서도 부착된 황금과립을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

포매제는 Epon 혼합액, Unicryl resin, Lowicryl K4M을 사용한 결과 Unicryl, Lowicryl K4M으로 포

매된 절편에서는 양성 결과를 얻을수 있었으나, Epon으로 포매한 절편에서는 양성 결과를 얻을 수 없었다(Fig. 3).

Unicryl로 포매된 절편과 Lowicryl K4M으로 포매된 절편의 결과는 차이가 없었으나 초박절편을 제작시 Lowicryl K4M은 경도가 약하여 절편이 떨리는 현상(chattering)이 발생하여 조직편의 두께에 차이가 발생하였다(Fig. 4).

조직 단백을 제거하기 위하여 사용된 proteinase K

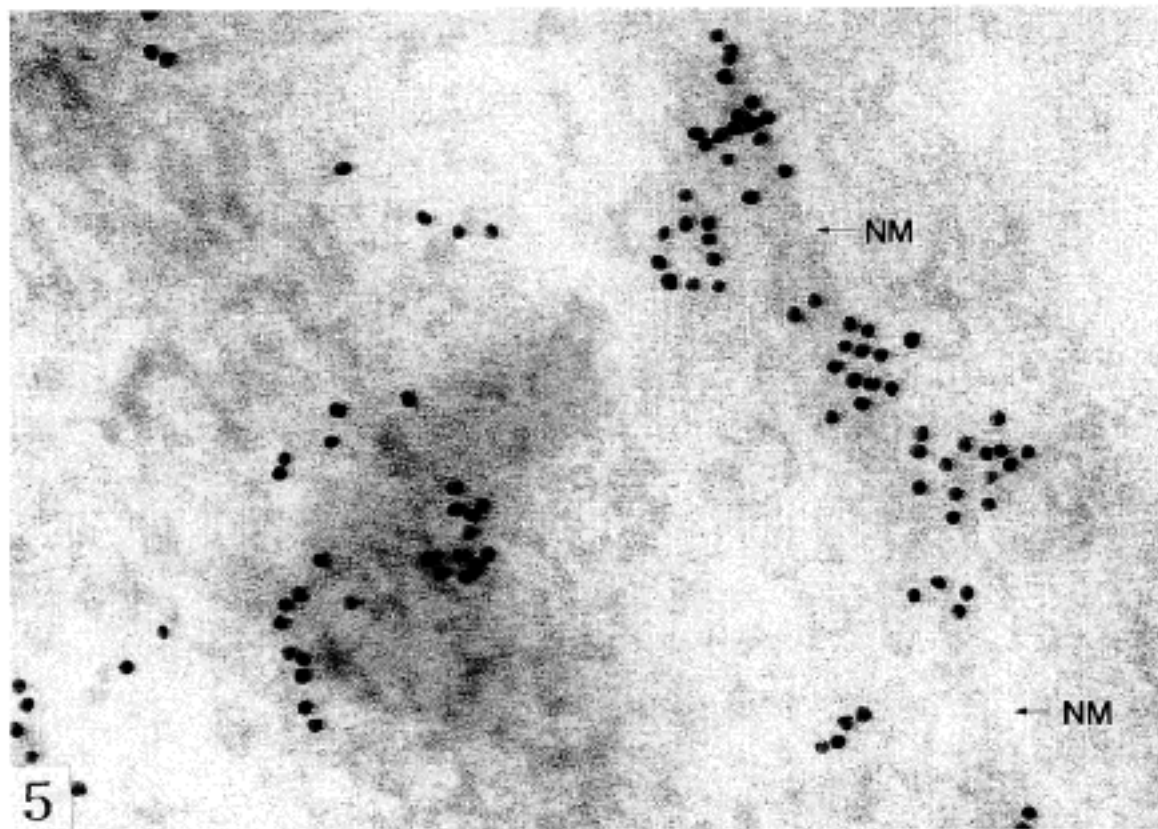


Fig. 5. Cellular architectures of HPV infected uterine cervix are destroyed in higher concentration of proteinase K. $\times 154,600$

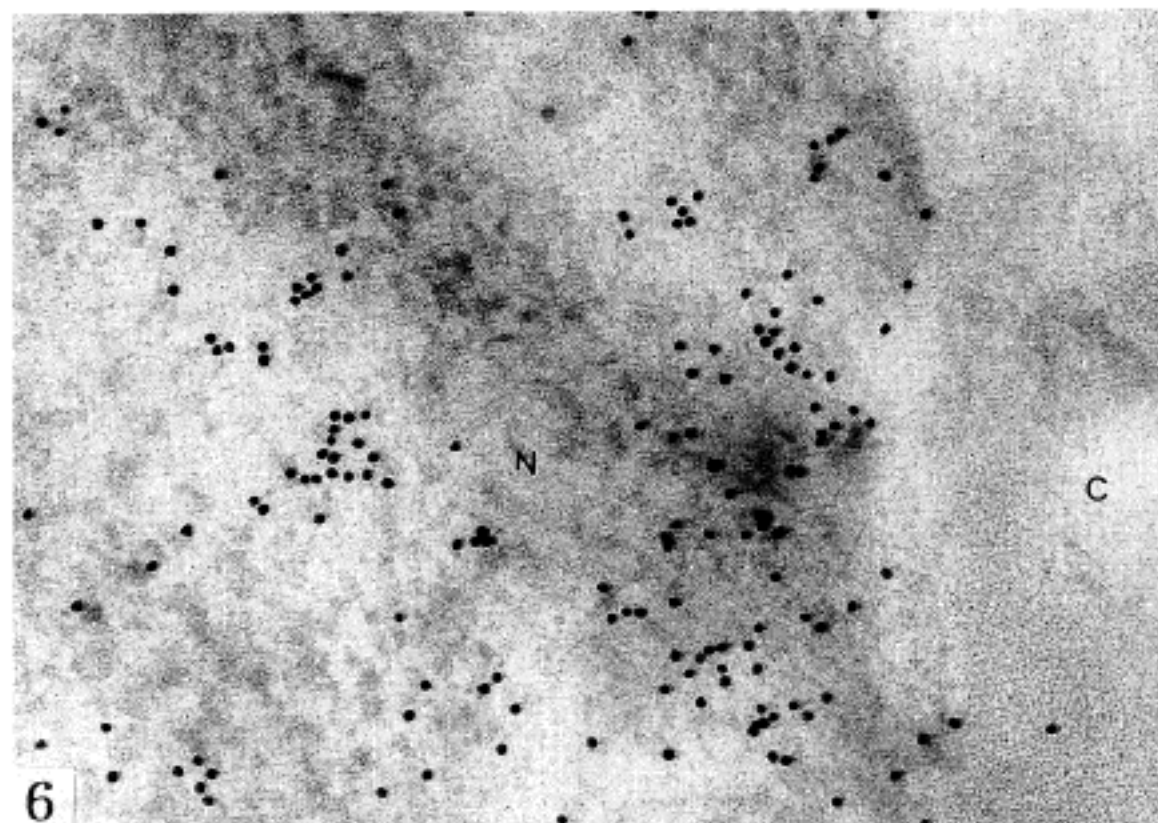


Fig. 6. DNA denaturation by 0.5N sodium hydroxide are obtained best result in HPV infected uterine cervix. $\times 108,600$

Table 1. Effect of enzymatic digestion procedures on cell morphology and in situ hybridization signal

Digestion procedure	Embedding	Cell morphology*	ISH signal**
Proteinase K			
1 μ g/ml	Epon	++	-
	Unicryl	++	++
	Lowicryl K4M	+	+
100 μ g/ml	Epon	++	-
	Unicryl	\pm	+
	Lowicryl K4M	\pm	+
Trypsin			
1 μ g/ml	Epon	++	-
	Unicryl	+	+
	Lowicryl K4M	+	+
100 μ g/ml	Epon	++	-
	Unicryl	\pm	+
	Lowicryl K4M	\pm	+

* ++: > 50% cells with visible structure, +: 10~50% cells with visible structure

\pm : < 10% cells with visible structure,

** ++: > 50% cells with visible gold particles, +: 10~50% cells with visible gold particle

\pm : <10% cells with visible gold particles, -: all cells are negative

Table 2. Effect of denaturation procedures on cell morphology and in situ hybridization signal

Digestion procedure	Embedding	Cell morphology*	ISH signal**
70% formamide	Epon	+	-
	Unicryl	\pm	\pm
	Lowicryl K4M	\pm	\pm
70% formamide + SSC	Epon	+	-
	Unicryl	\pm	\pm
	Lowicryl K4M	\pm	\pm
0.5N Sodium hydroxide	Epon	+	-
	Unicryl	+	+
	Lowicryl K4M	+	+
0.5N Sodium hydroxide + SSC	Epon	+	-
	Unicryl	+	+
	Lowicryl K4M	+	+

* ++: > 50% cells with visible structure, +: 10~50% cells with visible structure

\pm : < 10% cells with visible structure

** +: 10~50% cells with visible gold particles

\pm : < 10% cells with visible gold particles and background stain

-: all cells negative

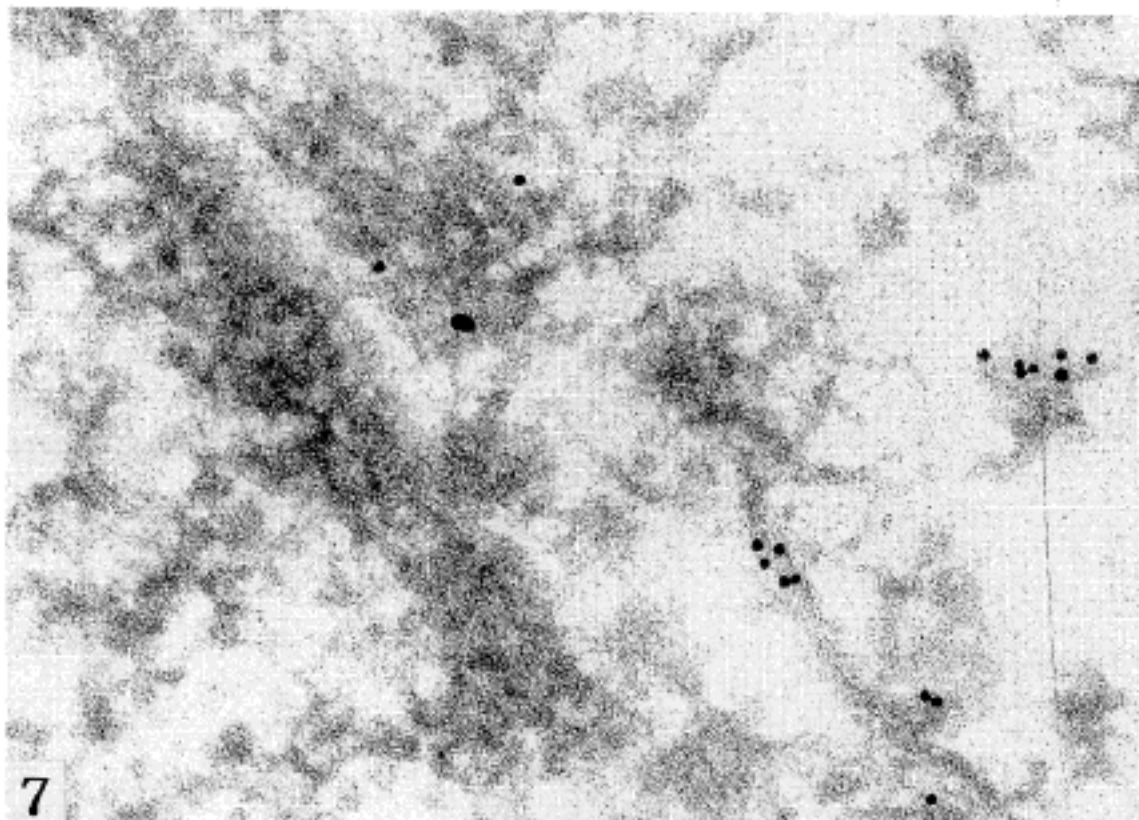


Fig. 7. DNA denaturation by formamide are obtained bad results. The nucleoplasm is destroyed in HPV infected uterine cervix. $\times 124,700$

와 trypsin을 각각 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 으로 희석하여 반응시킨 결과, 저농도(1 g/ml)로 반응시킨 경우 조직의 미세구조의 관찰이 용이하였으나, 농도를 높힌 경우(100 g/ml)에는 세포 형태의 유지가 불량하였다 (Fig. 5)(Table 1).

DNA를 변성시키기 위하여 70% formamide, 70% formamide와 SSC의 혼합액을 사용한 결과 모두 양성 소견을 얻을 수 있었다. 그러나 염기용액인 sodium hydroxide만을 이용한 경우 황금과립이 다수 관찰되었고, 세포의 형태에도 영향을 미치지 않아 가장 좋

은 결과를 얻을 수 있었으며(Fig. 6), 70% formamide가 혼합된 용액에서는 세포의 변성이 심하여 황금과립의 수도 적고 국지화가 어려웠다(Fig. 7)(Table 2).

Hybridization시 HPV DNA 탐색자의 반응 시간과 온도를 달리하여 1시간 또는 24시간동안, 37°C 또는 41°C에서 각각 반응시켰으나 반응 시간과 온도에 따른 차이가 없었다.

여분의 탐색자를 제거한 후 배경 염색을 줄이기 위하여 정상 염소 혈청과 탈지유를 사용하였다. 10% 정상 염소 혈청을 사용한 경우에는 배경염색을

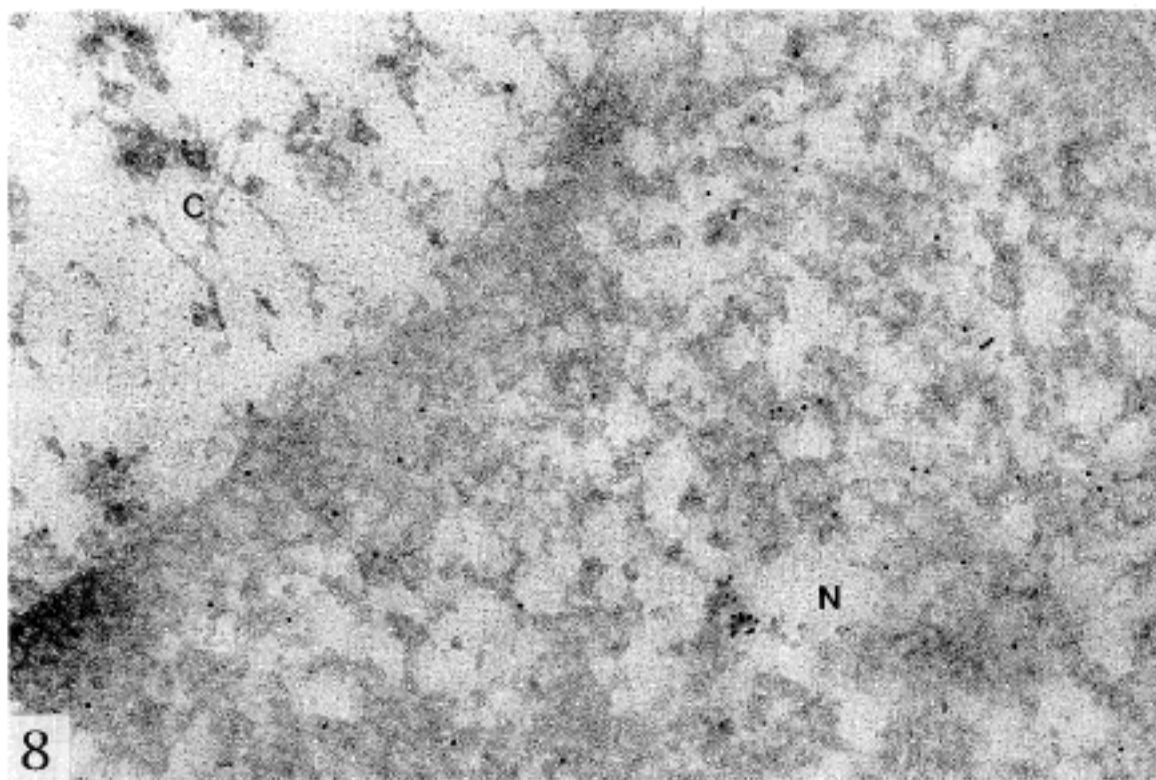


Fig. 8. The background stains are not effectively reduced by 10% bovine goat serum. $\times 53,800$

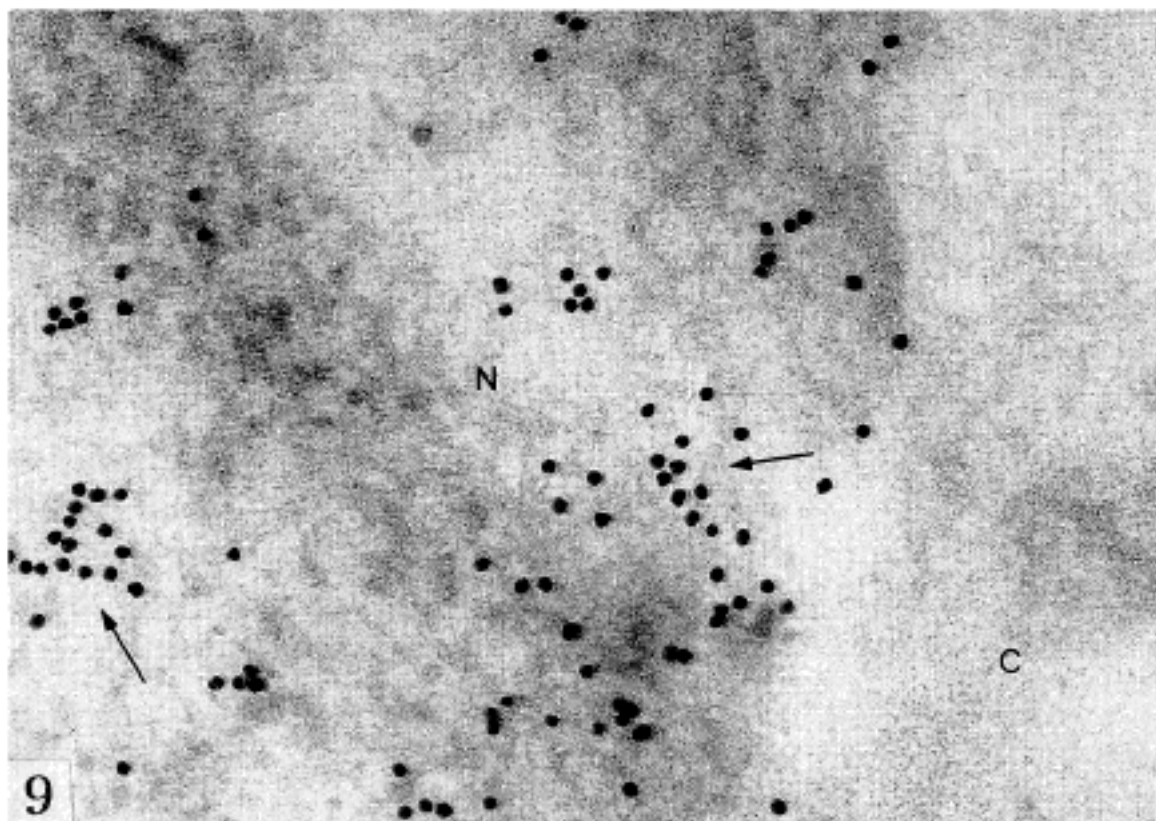


Fig. 9. Viral DNA labelling are localized mainly within the nucleus (arrows), both within and at edge of electron dense regions in the EBV infected lymphoid B-cell line. $\times 159,600$

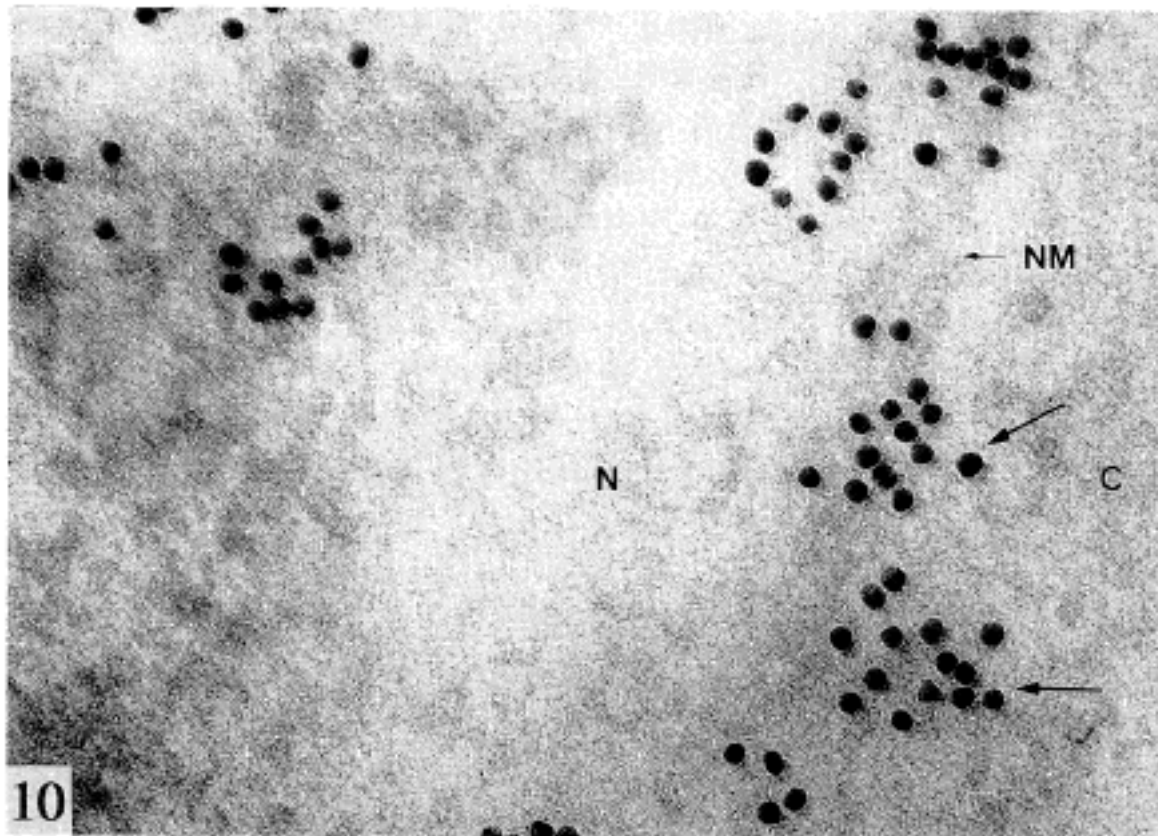


Fig. 10. Labelling pattern is dense, roughly spherical and linear shape in the EBV-infected lymphoid B-cell line. Nuclear budding-like area (arrow) show also positive signal. $\times 244,700$

효과적으로 줄이지 못하여 배경에 황금 과립의 부착이 많이 관찰되었으나(Fig. 8), 탈지유를 사용한 경우에는 배경 염색이 거의 나타나지 않았다.

ISH 후 전자현미경으로 관찰하면 양성 반응인 경우 황금 과립이 핵내에 광범위하게 흩어져 나타났으며, 특히 핵질이 진하게 염색되는 부위와 그 변연부 또는 핵막에 연한 부위에 많았었고(Fig. 9). 어떤 세포에서는 핵막이 budding하는 양상으로 나타나는 부위에서도 관찰되었다(Fig. 10). 개개의 황금 과립은 보통 뭉쳐서 구형으로 나타나며, 크기도 다양하고, 이들이 환상 또는 선상으로 나타나는 경우도 관찰되었다.

고 찰

분자생물학적 방법을 이용한 ISH를 시행하여 조직내 특수 DNA를 인지할 수 있는데, 이를 전자현미경에 적용하면 초미세형태와 더불어 DNA의 국지화가 가능할 것으로 여겨진다. 그러나 지금까지 보고된 대부분의 전자현미경적 ISH는 포매전에 ISH를 시행하는 포매전 방법이었으나^{3,8-10}, 본 연구에서는 포매후 방법으로 전자현미경적 ISH를 시행하여 HPV DNA와 EBV DNA의 초미세형태학적 위치를 성공적으로 국지화 할 수 있었다. 포매전에 ISH를 시행한 방법은 동결절편 조직이나 고정액으로 고정한 조직을 포매하기 전에 ISH를 시행함으로써 DNA나 RNA의 분포양상을 입체적으로 관찰할 수 있는

방법으로 알려져 왔다. 그러나 사용되는 탐색자나 황금과립의 조직내 침투가 한정되므로 ISH 시행후 삭정시 관찰하고자 하는 조직이 손실되기 쉽고, 조직이 고정되지 않는 상태에서 장시간 조작되므로 세포의 손상이 일어나 전자현미경적 관찰시 정확한 국지화가 어렵게 될 수 있다. 또한 포매 전에 ISH를 시행하였으므로 그후의 조작과정에서 부착된 탐색자나 황금과립의 소실이 있을 수 있다. 그러므로 최근에는 조직을 고정하고 포매한 후 grid에 조직절편을 얹어 이를 ISH하는 방법이 개발되고 있다. 포매후 방법은 조직의 고정, 탈수, 포매제의 침투 및 중합, 절편제작, 단백효소 처리, DNA나 RNA의 변성, 탐색자의 hybridization, 탐색자 인지 및 전자현미경적 관찰의 단계로 이루어져 있다. 이 과정에서 선택되는 시약의 종류와 시행 방법에 따라 그 결과에 많은 차이가 있으며^{10,14}, 이러한 점은 본 연구에서도 관찰할 수 있었다.

조직의 고정에 사용되는 고정액은 전자현미경적 관찰을 위한 첫 단계이므로 대단히 중요하고 전자현미경적 ISH의 장점인 세포내 소기관의 형태를 관찰할 수 있는가 하는 점이 결정된다. 본 연구에서는 glutaraldehyde와 paraformaldehyde를 이용하여 전.후고정 하였으며 glutaraldehyde의 농도는 2%와 0.2%를 선택하였다. 농도차에 따른 양성결과의 차이는 없었으나, 부착된 황금과립의 수적 차이는 있었다. 고농도(2%)인 경우 세포내 소기관의 형태는 잘 유지되어 관찰이 용이하였으나 부착된 황금과립의 수가

적었다. 이와 반대로 저농도(0.2%)를 이용한 경우 세포의 형태는 관찰이 용이하지 않아 윤곽만을 유지하고 있었으나, 부착된 황금과립의 수는 많았다. 이러한 점은 조직을 준비과정에 시행된 면역전자현미경적 염색시 더욱 두드러진 현상이었다. 그리고 일반 전자현미경 표본 제작시 이용되는 OsO₄(osmium tetroxide)는 ISH를 하기 위한 조직에서는 양성 결과를 얻을 수 없기 때문에 사용하지 않는다고 한다¹⁶. 그러므로 면역학적 방법을 위한 전자현미경 표본을 시행하려면 0.2% glutaraldehyde를 준비하는 것이 좋으리라 여겨진다.

조직의 포매에 이용되는 포매제는 많은 종류가 개발되어 있으나¹⁰, 면역전자현미경적 관찰을 위한 포매제가 갖추어져야 할 조건으로서는 cross-linking이 없어야 하며, 친수성이 있어야 한다. 전자현미경을 위한 포매제로 가장 많이 사용되고 있는 Epon은 소수성 제재로서 미세구조의 관찰면에서는 좋은 포매제이나 ISH의 포매후 방법에서는 양성소전이 관찰되지 않으므로 적절하지 않다. 그러므로 ISH의 포매후 방법에서는 먼저 항원성의 복원이나 친수성을 갖게하는 처치가 선행되어야 할 것으로 생각되며, 여러가지 방법이 개발되고 있으나 아직 좋은 결과를 얻지 못하고 있다¹⁷. 현재 사용되는 친수성 포매제로서는 LR white와 LR gold, Lowicryl 계열의 HM20, HM23, K4M, 그외 low-acid glycol methacrylate, Acrytron E 등이 있으며 최근 acrylic resin인 Unicryl이 개발되어 이용되고 있다. 본 연구에서는 Lowicryl 계열의 K4M과 Unicryl resin을 사용하였다. Lowicryl 계열의 제재는 methacrylate를 변형시켜 만든 포매제로서 고온에서 열중합하는 경우보다 저온에서 중합시킨 경우 양호한 결과를 얻을 수 있으며, 특히 면역세포화학적 방법을 이용한 연구에서 반응성이 좋은 것으로 알려져 있다^{4,11,18,19}. K4M은 본 연구에서도 양호한 결과를 얻을 수 있었으나 block의 정도가 약하여 조직 절편의 제작시 떨림현상(chattering)이 발생하였다. 이는 아마도 친수성이 높아 수분이 많이 함유된 탓으로 여겨진다. Unicryl은 새로운 acrylic resin으로 광학 및 전자현미경적 검사를 위하여 최근에 개발된 포매제이다²⁰. 이 resin은 친수성이 높고 균질성의 구조를 지니고 있어 특히 전자현미경적 관찰에 좋은 결과를 얻을 수 있다고 한다. 본 연구에서도 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었고 배경염색의 정도도 낮았으며, block의 정도도 높아 초박절편 제작이 용이하였다. 이 resin은 연구목적에 따라 고온과 저온에서 중합시킬 수 있으며, 온도에 민감하지 않는 조직의 경우 고온 중합법이 이용되고

있으나 면역조직화학적 방법에서는 영향이 있을 수 있으므로 본 연구에서는 저온법으로 중합시켰다.

Hybridization의 전단계로 세포내 단백성분을 제거하여 탐색자가 핵질에 잘 부착되도록 단백분해효소가 사용되고 있다^{6,21-23}. 그러나 이들 효소에 의한 조직 파괴가 있으므로 미세구조를 관찰하기 위해서는 그 농도의 조절이 중요하며, 동결절편으로 ISH를 시행하는 경우에는 일반적으로 시행하지 않는 경향이다¹⁴. 본 연구에서 Tris 완충액과 EDTA가 포함된 용액에 여러 농도의 proteinase K와 trypsin을 사용하였던 바 모두에서 양성 소전이 관찰되었으나 농도가 높은 경우 조직의 구조물을 관찰하기가 어려웠다.

조직내 DNA를 변성시키는 방법도 여러가지가 알려져 있다. 가장 쉬운 방법은 가열 방법이나, 전자현미경적 ISH시에는 조직 절편의 두께가 얇고 작으므로 열에 의한 조직절편의 소실을 방지하기 위하여 coverslip으로 grid를 덮은 후 가열하여야 하지만 권장되는 방법은 아니다. 또한 산이나 염기를 가하여 변성시키는 방법으로 hydrochloric acid, sodium hydroxide, standard saline citrate, formamide 등을 단독 혹은 혼합하여 사용하고 있으나^{13,24,25} 전자현미경적 ISH 시에는 염기에 의한 변성효과가 좋고, formamide의 사용은 좋지 않는 것으로 알려져 있다^{14,23}. 저자의 연구에서도 0.5N sodium hydroxide를 이용한 경우 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, formamide를 이용한 경우에는 조직 파괴가 심하고 배경염색의 정도가 높아 좋지 않았다.

Hybridization이 완료된 후 탐색자의 신호를 인지하는 방법으로 지금까지는 자기방사기록법(autoradiography)이 주로 이용되어 왔으나, 최근에는 여러가지 변형된 비방사선적 방법이 이용되고 있다. 전자현미경적 ISH에서 탐색자의 표지자로서 Ig-ferritin conjugate가 사용되어 왔으나 해상도가 낮고, 특히 과립성의 배경이 있을 때는 감별이 용이하지 않는 단점이 있다. 황금과립은 크기가 일정하고 높은 전자 불투과성이어서 주변 구조물과의 감별이 용이하기 때문에 황금과립과 식물에서 추출한 즙으로 제작하여 만든 colloidal gold는 면역세포화학적 연구에 많이 이용되고 있다. gold 탐색자의 종류가 다양한 것은 colloidal gold에 붙이는 물질이 다양하기 때문이다. 즉 거대분자로 이루어진 포도상구균성 A 단백질, 연쇄상구균성 G단백, 면역글로불린, avidin, streptavidin, lectin, biotin, glycoprotein, toxin, lipoprotein, polysaccharide, 기타 효소들을 피복하여 이용하고 있다. 저자는 현재 많이 사용되고 있는 A 단백을 결합한

immunogold conjugate를 사용하였다. 황금과립의 직경은 15nm였고 관찰시 주변 조직과의 감별이 용이하였으며, 20,000배 시야에서도 과립을 인지할 수 있었다. Immuno-gold conjugate는 colloidal gold에 면역글로블린이 흡수되는 것을 이용하여 만든 것으로서 항원의 소실이 적어, 면역염색이나 ISH시 direct one-step 탐색자를 인지하는데 사용되고 있다.

이상의 연구를 종합하여 보면 조직 고정은 0.2% glutaraldehyde와 4% paraformaldehyde로, grid는 전자처리하여 피막을 제작하여 사용하고, 포매제는 Unicryl, 단백성분 제거는 농도가 낮은 proteinase K나 trypsin을, DNA 변성은 0.5N sodium hydroxide, 탐색자의 인지는 immuno-gold conjugate를 이용한 경우 전자현미경적 ISH에서 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 연구를 좀 더 확장하여 virus의 DNA나 RNA 뿐만 아니라 종양을 일으키는 종양 유전자를 종양세포내에서 국지화하여 이를 확인하거나 동정하는데 이용하면 더 좋을 것으로 여겨진다.

결 론

면역조직화학적 및 면역전자현미경적 염색과 광학현미경적 ISH 그리고 PCR을 시행하여 HPV 감염이 확인된 자궁경부암과, EBV의 존재가 확인된 세포주를 대상으로 여러가지 방법을 이용한 포매후 전자현미경적 ISH을 시행하고 기존의 연구방법과 비교한 결과는 다음과 같다.

1) 피검조직의 고정은 0.2% glutaraldehyde와 4% paraformaldehyde 용액에 고정한 경우에 양성 황금과립의 부착이 많았다.

2) 포매제는 Unicryl resin과 Lowicryl K4M을 이용한 경우에만 양성결과를 얻을 수 있었으며, Epon에 포매된 조직에서는 반응을 볼 수 없었다. 특히 Unicryl resin을 이용한 경우에 조직절편 제작이 더 용이하였다.

3) 조직내 단백질의 제거제로서 proteinase K, trypsin을 이용할 경우 모두 세포구조의 관찰이 용이하였으나 이들의 농도를 높이면 세포구조의 관찰이 용이하지 않았다.

4) DNA의 변성 방법으로 70% formamide, 70% formamide와 standard saline citrate (SSC) 혼합액, 0.5 N sodium hydroxide, 0.5 N sodium hydroxide와 SSC를 혼합한 경우로 시행하였으며, 이들 모두에서 양성 결과를 얻을 수 있었으나 sodium hydroxide를 사용한 경우 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

5) DNA 탐색자의 hybridization은 37°C에서 1시간

정도 반응을 시키는 것이 좋으리라 생각된다.

6) 탐색자 표지자로서는 immunogold conjugate가 좋았으며, 특히 핵막에 연한 부분과 핵질에서의 국지화가 잘 관찰되었다. 관찰되는 양상은 대개 소군집 형태이거나 구상으로 뭉쳐져 있는 형태가 많았다.

이상의 연구를 종합하여 보면 조직 고정은 0.2% glutaraldehyde와 4% paraformaldehyde로, grid는 피막을 제작하여 사용하고, 포매제는 Unicryl, 단백성분 제거는 농도가 낮은 proteinase K나 trypsin을, DNA 변성은 0.5 N sodium hydroxide, 탐색자의 인지는 immuno-gold conjugate를 이용한 경우 전자현미경적 ISH에서 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 연구를 좀 더 확장하여 virus의 DNA나RNA 뿐만 아니라 종양을 일으키는 종양유전자를 종양세포내에서 국지화하여 이를 확인하거나 동정하는데 이용하면 더 좋을 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybridmolecules in cytological preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 378-83.
- Wolber RA, Beals TF. Streptavidin-gold labeling for ultrastructural in situ nucleic acid hybridization. In: *Colloidal gold. Principles, methods and application.* New York, Academic Press, 1989; 379.
- Hutchinson NI, Langer-Safer PR, Ward DC, Hamkalo BA. In situ hybridization at the electron microscopic level: Hybrid detection by autoradiography and colloidal gold. *J Cell Biol* 1982; 95: 609-18.
- Binder M, Tourments S, Roth J, Renaud M, Gehring WJ. In situ hybridization at the electron-microscope level: Localization of transcripts on ultrathin sections of Lowicryl K4M- embedded tissues using biotinylated probes and protein A-gold complexes. *J Cell Biol* 1986; 102: 1646-53.
- Binder M. In situ hybridization at the electron microscopic level. *Scanning Microsc* 1987; 1: 331-8.
- Wolber RA, Beals TF, Lloyd RV, Maassab HF. Ultrastructural localization of viral nucleic acid by in situ hybridization. *Lab Invest* 1988; 59: 144-51.
- Wolber RA, Beals TF, Maassab HF. Ultrastructural localization of herpes simplex virus RNA by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 97-104.
- Hamkalo BA, Narayanswami S, Lundgren K. Localization of nucleic acid sequences by EM in situ

- hybridization using colloidal gold labels. *Am J Anat* 1989; 185: 197-204.
9. Beals TF. Ultrastructure of in situ hybridization. *Ultrastruct Pathol* 1992; 16: 87-93.
 10. Stirling JW. Immuno and affinity probes for electron microscopy: A review of labelling and preparation. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 145-57.
 11. Acetarin JD, Carlemalm E, Villiger W. Development of new lowicryl resins for embedding biological specimens at even lower temperatures. *J Microsc* 1986; 143: 81-8.
 12. Newman GR, Hobot JA. Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 971-81.
 13. Puvion-Dutilleul F, Puvion E. Ultrastructural localization of viral DNA in thin sections of herpes simplex virus type 1 infected cells by in situ hybridization. *Eur J Cell Biol* 1989; 49: 99-109.
 14. Mandry P, Murray B, Rieke L, Becke H, Hofler H. Postembedding ultrastructural in situ hybridization on ultrathin cryosections and LR white resin sections. *Ultrastruct Pathol* 1993; 17: 185-94.
 15. Katsumata M, Lo CW. Organization of chromosomes in the mouse nucleus. Analysis by in situ hybridization. *J Cell Sci* 1988; 90: 193-9.
 16. Wachtler F, Mosgoller W, Schwarzacher HG. Electron microscopic in situ hybridization and autoradiography: Localization and transcription of rDNA in human lymphocyte nucleoli. *Exp Cell Res* 1990; 187: 346-8.
 17. Berryman MA, Porter WR, Rodewald RD, Hubbard AL. Effects of tannic acid on antigenicity and membrane contrast in ultrastructural immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 845-57.
 18. Armbruster BL, Carlemalm E, Chiovetti R. Specimen preparation for electron microscopy using low temperature resins. *J Microsc* 1982; 126: 77-85.
 19. Carlemalm E, Garavito RM, Villiger W. Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *L Microsc* 1982; 126: 123-43.
 20. Scala C, Cenacchi G, Ferrari C, Pasquinelli G, Preda P, Manara GC. A new acrylic resin formulation. A useful tool for histological, ultrastructural and immunocytochemical investigations. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1799-804.
 21. Fey EG, Krochmalnic G, Penman S. The non-chromatin substructures of the nucleus: The ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J Cell Biol* 1986; 102: 1654-65.
 22. Hofler H. What's new "in situ hybridization". *Pathol Res Pract* 1987; 182: 421-30.
 23. Van Goor H, Harms G, Gerrits PO, Kroese FGM, Poppema S, Grond J. Immunohisto-chemical antigen demonstration in plastic-embedded lymphoid tissue. *J Histochem Cytochem* 1988; 36: 115-20.
 24. Jacob JK, Todd K, Birnstiel ML, Bird A. Molecular hybridization of 3H-labelled ribosomal RNA in ultrathin sections prepared for electron microscopy. *Biochem Biophys Acta* 1971; 228: 761-76.
 25. Thiry M, Thirty-Blaise L. In situ hybridization at the electron microscopic level: An improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA. *Eur J Cell Biol* 1989; 50: 235-43.
 26. Langer-Safer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 78: 6633-7.
 27. Forster AC, McInnes JL, Skingle DC, Symons RH. Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 745-61.
 28. Cremers AFM, Jansen in de Wal N, Wiegant J. Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection system using reflection-contrast and electron microscopy. *Histochemistry* 1987; 86: 609-15.
 29. Wolber RA, Beals TF. Streptavidin-gold labeling for ultrastructural in situ nucleic acid hybridization. In: *Colloidal gold. Principles, methods and application.* New York, Jovanovich, 1988; 185.
 30. Speel EJM, Schutte B, Ramaekers FCS. The effect of avidin-biotin interactions in detection systems for in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 135-41.
 31. Williams MA. Autoradiography and immunocytochemistry. In: *Practical methods in electron microscopy.* Amsterdam, North-Holland Publishing, 1977; 1.
 32. Tolson ND, Boothroyd B, Hopkins CR. Cell surface labelling with gold colloid particulates: The use of avidin and staphylococcal protein A-coated gold in conjugation with biotin and Fc-bearing ligands. *J Microsc* 1981; 123: 215-26.
 33. Roth J, Bendayan M, Orci L. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein

- A-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 1074-81.
34. Roth J. Application of lectin gold complexes for electron microscopic localization of glyco-conjugates on ultrathin sections. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 987-99.
35. Horisberger M. Electron-opaque markers: A review. In: *Immunolabelling for electron microscopy*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984; 17.
36. Bonnard C, Papermaster DS, Kraehenbuhl JP. The streptavidin-biotin bridge technique: Application in light and electron microscopic immunocytochemistry. In: *Immunolabelling for electron microscopy*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984; 95.
37. Slot JW, Geuze HJ. Gold markers for single and double immunolabelling of ultrathin cryosections. In: *Immunolabelling for electron microscopy*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984; 129.
38. Damjanov I. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab Invest* 1987; 57: 5-20.
39. Bendayan M, Nanci A, Kan FWK. Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 983-96.
40. Singer RH, Langevin GL, Lawrence JB. Ultrastructural visualization of cytoskeletal mRNAs and their associated proteins using double-label in situ hybridization. *J Cell Biol* 1989; 108: 2343-53.
-