

## I. 조직채취(Sampling)

- 1) SEM 조직에서도 TEM 에서와 마찬가지로 가능하면 적게 채취한다. 그러나 관찰하고자 하는 표면적은 넓고, 두께는 얇게 채취하는 것이 좋다. (소장, 어떤 조직의 surface 를 볼 경우)
- 2) Fracture(할단)를 할 경우는 조직을 할단할 때 용이하게 하기 위하여 한쪽을 약간 길게, 즉 1x1x4mm 정도로 채취한다.
- 3) Fracture를 할 조직을 제외하고는 pH7.2 - 7.4 정도의 buffer 나 saline을 이용하여 고정 전에 surface 에 부착된 이물질을 반드시 제거하여야 한다(소장, 위장 등).
- 4) 실험동물을 사용 시에는 마취후 살아있는 상태 하에서 필요 부분을 잘라낸 후 신속히 고정액에 담그어야 하며, 해부시 시간이 오래 걸리거나 조직이 손상되기 쉬운 조직은 관류고정을 실시한 후 조직을 분리한다(뇌조직).

## II. 고정(Fixation)

### 1) 고정의 목적

1. 고정이란 세포의 autolysis를 방지하고 세포성분의 응고 및 경화 시키는 것이다.
2. 세포의 구조가 살아있는 상태에서의 변화를 최소화시켜서 잘 보존시킨다.
3. 탈수 과정 및 후에 전자 beam 에 노출 되었을 때 조직을 보존하기 위함이다.

### 2) 고정액 (fixative)의 선택

1. 이상적인 고정액은 조직의 수축 또는 팽창등의 변화를 최소화하며 빨리조직 내에 침투하는 고정액이다.
2. 전고정에는 aldehyde 계통은 2%정도의 glutaraldehyde fixative나 2% 정도의 paraformaldehyde fixative가 많이 사용된다.
3. TEM 조직 고정에는 glutar. fixative 단독으로 사용하거나 paraform.과 glutar. 혼합 fixative를 많이 사용한다.
4. SEM 조직 고정시 특히 할단용 시료는 glutar. fixative 만을 사용하는 것이 좋다.
5. 후고정에는 중금속인 1 - 2% OsO<sub>4</sub>를 사용하여 조직을 더욱 안정시키고 전기전도성을 증가 시킨다.

### 3) 완충액(buffer)의 사용

1. 고정액의 pH와 삼투압을 조절하기 위하여 완충액을 사용함(동물시료; pH 7.2 - 7.4, 식물시료; pH 6.6 - 6.8, 물을 많이 함유하고 있는 시료 즉 원생동물, 태아기 조직 등; pH8.0 - 8.5).
2. 전고정과 후고정 사이에서 이들 고정액들 간의 화학적 반응을 방지하기 위하여 고정액에 사용된 같은 buffer 로 세척을 한다.
3. 후고정후에도 과도한 fixative 의 제거 및 고정액과 탈수제 사이의 반응을 방지하기 위하여 세척을 한다.
4. Buffer 에는 phosphate, cacodylate, ueronal acetate buffer외 많은 종류가 사용되나 통상 phosphate 나 cacodylate buffer가 많이 사용됨.

### 4) 고정액의 온도 및 시간

1. Autolysis또는 extraction 을 최소화하기 위해서 0 - 4°C 의 저온에서 실시하는 것이 좋다(특히 소화효소를 다량 함유한 채장).
2. 전고정액에는 2 - 4시간 고정한다.(경우에 따라서 over night 시킨다.)
3. 후고정액 (OsO<sub>4</sub>)에는 1 - 2시간 정도 고정한다. OsO<sub>4</sub>를 이용하여 화학적 etching 을 할 경우에는 2 -3일 정도 시행한다.
4. RBC 또는 단세포 시료는 시료가 매우 작으므로 전고정을 1시간, 후고정을 30분 정도로 줄여도 무방하다.

### 5) 고정액 사용시 주의 사항

1. OsO<sub>4</sub>는 1gm 으로 시판되는데 용해가 잘 안되므로 최소한 사용하기 1일전 증류수에 2% 용액으로 만들어 갈색 병에 담아서 냉장고에 보관한다.
2. 고정액은 눈, 코의 점막, 기도 등에 손상을 주므로 작업 시에는 반드시 hood에서 다룬다.

## III. 탈수(Dehydration)

### 1) 목적

1. 시료중 수분이 남아 있으면 건조할 때 물의 표면 장력에 의해 조직에 변형을 초래한다.
2. 인계점 건조시 사용되는 액체 CO<sub>2</sub> 나 freon등과 물은 완전히 혼합되지 않으므로 제거하여야 한다.
3. 탈수시는 물보다 표면 장력이 낮은 유기 용매로 서서히 대체시킨다. 즉 50%부터

100% 까지 점차로 대체시킨다.

## 2) 탈수방법 및 시간

1. 조직의 성질과 크기 등에 따라서 탈수 시간이 달라지나 가능한 한 짧은 시간 내에 실시한다.
2. 탈수시간이 너무 길면 조직으로 부터 물질의 유출 (extration)의 우려와 조직의 수축 등이 일어 날 수 있다.
3. 탈수의 실제방법

50%	Ethanol	10 - 20 min	1회
60%	”	”	“
70%	”	“	”
90%	“	”	“
95%	”	“	”
100%	“	”	3회

## 4. Isoamyl acetate 에 치환

Iso : Ethanol	- 1:3	10 - 15 min	1회
	1:1	“	”
	3:1	“	”
Ab. Iso	-	10 - 20 min	2회

## IV. 건조(Dry)

### 1) 목적

탈수 후 시료에 포함되어 있는 탈수용액을 제거하기 위하여 실시하며 건조가 완전하지 않을 경우에는 진공에 방해가 되고 진공 중에서 시료가 수축되며 coating이 원활히 실시될 수 없으므로 시료의 보존과 좋은 coating을 얻기 위하여 완전히 건조되어야 한다.

### 2) 방법

Air dry(단단한 유각류), Freeze dry, C P D 이용 등이 있으며 통상 일반적인 조직은 C P D를 많이 사용하나, 배양시료 같이 plastic dish 채로 건조를 하는 경우에는 HMDS(hex ametyl-disilazane) 또는 TMS(tetrametyl-silane) 등의 시약을 이용하기도 한다.

## V. 시료의 부착

건조가 완료된 시료를 silver paste, 양면 tape, 목공용 본드 등을 이용하여 시료대(stub)에 부착한다. 관찰시 charge-up 현상을 고려하여 윗부분이 아랫부분보다 넓게 시료를 트리밍 하여 부착시키는 것이 좋다.

## VI. 증착(Coating)

### 1) 목적

1. 비전도성 시료의 도체화 (charge-up 현상의 방지): 비전도성 시료 (생물체)의 경우 조사된 전자선의 일부가 시료 내에 charge-up 되어 상에 이상 contrast 또는 상의 distortion 등이 생기게 되므로 이것을 방지하고자 실시한다.
2. 전자선 손상의 경감: 시료 중에는 조사된 전자에 의해 시료가 분해되기도 하고 화학 반응을 일으키기도 하므로 (특히 고분자, 생물시료)이것을 방지 하고자 coating 을 하면 coating 막이 시료에 전자선의 직접 접촉을 방지하여 열에 대하여 보호해주고 시료의 수축 및 팽창도 방지 할 수 있다.
3. 2차 전자 방출증가: SEM을 시료로 부터 2차 전자상을 관찰하기 위해서는 2차 전자 발생이 많을수록 좋으므로 coating을 한다.
4. 표면만의 정보로 한정: SEM은 시료 표면으로 부터의 2차 전자만으로 상의 형성이 되는 것이 아니라 내부의 정보를 가진 전자도 반사되어 나오므로 여러 가지 정보가 혼입되어 있다. 따라서 coating을 하여 내부 정보를 차단하여 표면의 정보만을 관찰할 수 있게 한다.

### 2) 방법

1. 일반적으로 ion coater를 사용하여 진공상태가 비교적 낮은 0.05 torr정도로 배기된 chamber 안에서 coating을 한다.
2. Pt, Au, Au-Pd, Pt-Pd등의 금속을 이용하여 100 - 200 Å 정도의 두께로 coating을 실시한다.
3. F.E.SEM의 경우는 매우 낮은 가속 전압 (2kv 이하)에서도 좋은 상을 관찰할 수 있으므로 는 매우 얇게 coating하여야 좋은 관찰상을 얻을 수 있다.
4. Natural SEM(Low Vacuum SEM)으로 시료를 관찰할 경우에는 coating하지 않아도 관찰이 가능하며 나뭇잎 또는 섬유 등의 관찰에 적합하지만 수분을 함유한 시료는 관찰시간이 경과함에 따라서 시료에 변형이 발생한다.