

제5장. 고정(Fixation)과 탈기(Aspiration)

- 일반적으로 microtechnique의 목적은 cell 과 tissue의 구조와 기능을 연구하기 위한 것인데 living tissue를 연구하는 것은 fixed tissue를 연구하는 것보다 쉽다.
- 하지만 unfixed tissue는 parent organism 으로부터 본래의 구조를 빠르게 loss할 가능성이 크다.
- Botanical microtechnique에서 가장 중요한 조작중의 하나가 원형질을 'killing'하고 'fixing'하는 것이다. Killing은 cell내의 life processes가 비가역적으로 정지함을 의미.

- Fixation이라 함은 생활하고 있는 그대로는 관찰하기 어려운 세포 또는 조직의 동적인 상태를 순간적으로 정지시켜 살아있는 상태와 가깝게 만드는 것을 말한다.
- 이때 사용되는 agent를 fixative agent 또는 fixative solution(고정액)이라 한다.
- 본 실험에서는 여러 fixative 중 FAA (formalin-acetic acid-alcohol) 용액을 쓰고 있으며, 그 조성은 다음과 같다.

Prepare of fixatives

- F.A.A.(formalin-Acetic acid-Alcohol)----
100ml
- Formalin (37-40%) ----- 10 ml
- Acetic acid (glacial)----- 5 ml
- Ethyl alcohol (95%) ----- 50 ml
- Distilled water ----- 35 ml

- Fixation하기 몇시간 전에 FAA을 만들어 가지달린 flask(250 ml 이내)에 보관시킨 후 parafilm 등으로 밀봉시킨다. 그 다음 냉장고 (4-6°C)에 보관시켜 cold FAA을 fixation에 사용할 수 있도록 준비한다.
- 여름에는 실온에 너무 오래 두어 warm FAA가 되지 않도록 한다. Autolysis rate가 온도와 함께 증가한다. 따라서, 4°C가 fixation에 가장 좋다.

- 동물조직이나 식물조직이 모두 신선해야 한다.
- 재료가 죽으면 곧 조직내의 효소에 의해 자가분해(Autolysis) 되며, bacteria에 의해 세포 내용물의 분해(or 부패)가 일어나기 때문.
- 고정재료는 가능한 한 작은 절편
- (2-3 mm × 5-7 mm)

제1절. 고정 목적, 방법, 조건 및 시간

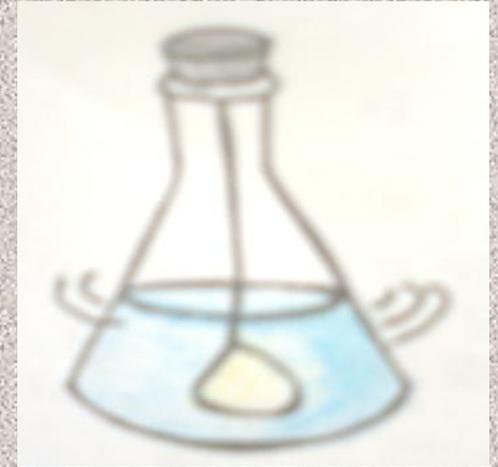
- 1. 고정하는 이유, 목적
 - 1) 고정하는 이유; 세포내의 structural disturbance를 최소화하며, 조직내 세포배열의 distortion을 최소화하는데 있다.
 - 2) 고정하는 목적; To preserve the material in the sharp it had before fixation, To preserve the nuclear elements of the material, To preserve the cytological elements of the material

- **2. 고정하는 방법**

- **1) 고정액은 재료의 최소한 20배 이상을 사용.**

- **2) Materials을 용도에 맞게 section한다. 이때에는 razor에 의한 물리적 압력을 가능한 한 줄이기 위해서 증류수를 적신 filter paper 위에 sharp razor로 자른다.**

- 3) 자른 materials을 거즈로 싼 후 실로 묶고 FAA가 담긴 solution flask(250ml)에 넣고 실을 바깥으로 뺀 후 Flask에 잘 맞는 rubber plug을 하고 vaselin으로 밀봉시킨다. 그 다음 aspirator에 연결된 호스에 연결하여 작동시킨다.



- 4) 고정온도는 저온이 좋다.
- 5) 고정시간은 재료와 용도에 따라 다르다. 고정액을 가끔 진탕한다.

- 3. 고정액의 조건

- 1) 조직 속에 속히 침투해서 곧 cell의 기능을 정지시킬 것.
- 2) 세포, 조직 내용물의 형상 및 위치가 가능한 한 변형되지 말 것.
- 3) 재료를 경화시키지 않을 것(경화시 절편 제작이 어렵다)
- 4) 응용력이 넓을 것(여러 가지 재료에 널리 사용가능 해야 함)
- 5) 사용이 용이하고 값이 싸 것.
- 6) 염색에 지장을 주어서는 안된다.

- 4. 고정하는 시간

- Fixation 시키는 시간은 전 technique을 통해 가장 중요한 과정 중의 하나이며, 이 시간을 너무 짧게 하면 section 이 문드러지고, 너무 길게 하면 section 시 깨진다. 따라서 각 plant material 은 그 특성과 두께등을 고려해야 한다.
- Pieces of thin leaf; 12 hr – 36hr
- Thick leaves or pieces of small stem; at least 24 hr – 48 hr
- Woody twigs; at least 1 week
- 고사리 줄기; 48 hr, Ivy 잎; 24 hr, Ivy petiole; 48 hr, 콩(나물) root; 12 hr, 소나무 leaf; 24 hr

제2절. 고정 장점, 고정액 종류 및 탈기

- 1. Fixed tissue가 갖는 장점
- 1) Fixed tissue can be embedded and sectioned rather easily for microscopic study in a variety of ways.
- 2) Cytohistochemical techniques have largely been worked out on fixed tissue.
- 3) Most staining procedures have been primarily elaborated for fixed tissue.
- 4) Fixed tissues facilitate the preparation of permanent slides which can be used at times convenient for the investigator and also serve as permanent research records.

- **2. Unfixed tissue는 다음의 factor에 의해 damage를 입을 수 있다.**
- **1) Drying**
- **2) Shrinking & swelling**
- **3) Autolysis**
- **4) Temperature**
- **5) Microbial attack**
- **6) pH etc.**

- **3. 고정에 영향을 미치는 요소**
- **1. Temperature**
- **2. pH**
- **3. Osmolality**
- **4. Rate of chemical & physical change**
- **5. Rate of penetration**
- **6. Time of fixation etc,**

- **4. 고정액의 종류**
- **(1) FAA (Formalin-Acetic Acid-Alcohol) ; Sass(1958), One of the most useful plant fixatives, 일반적으로 식물조직에 많이 사용되나 식물의 색이 잘 빠진다는 단점이 있다. 3~4주 정도의 재료 고정이 가능하다.**
- **Ethyl alcohol (95%) 50 ml + Glacial acetic acid 5 ml + Formalin 10 ml + D.W. 35 ml**

- (2) Nawaschin's Fluid ; 미생물, 곰팡이, 식물재료 고정에 사용된다.
- Sol. A ; chromic acid 5 g + glacial acetic acid 50 ml + D.W. 320 ml
- Sol. B ; neutral formalin 200 ml + D.W. 175 ml
- Sol. A와 B를 만들어 두고 사용직전에 1:1로 혼합하여 사용한다.

- **(3) Bouin's Fluid ; Root tip, Embryo sac fixation**
- **(4) Farmer's Fluid ; Cytological (chromosomal) studies**
- **(5) Carnoy's Fluid ; 고정(固定)이 잘 안되는 종자(種子)와 같은 재료의 고정(固定)에 사용된다.**
- **absolute alcohol 60 ml + chloroform 30 ml + acetic acid 10 ml**

- (6) Zirkle's Fluid ; Mitochondria, allied structure fixation
- (7) Glutaraldehyde-Osmium ; Most popular fixative for electron microscopy
- Osmium tetroxide (osmic acid) ; 강한 산화제로서 지방을 흑변시키며 protein을 급속히 응고시킨다. 세포학적 연구 및 EM용 절편의 고정에 사용된다. Osmic acid 는 쉽게 환원되므로 日光을 차단하는 100ml 들이 갈색병을 사용.

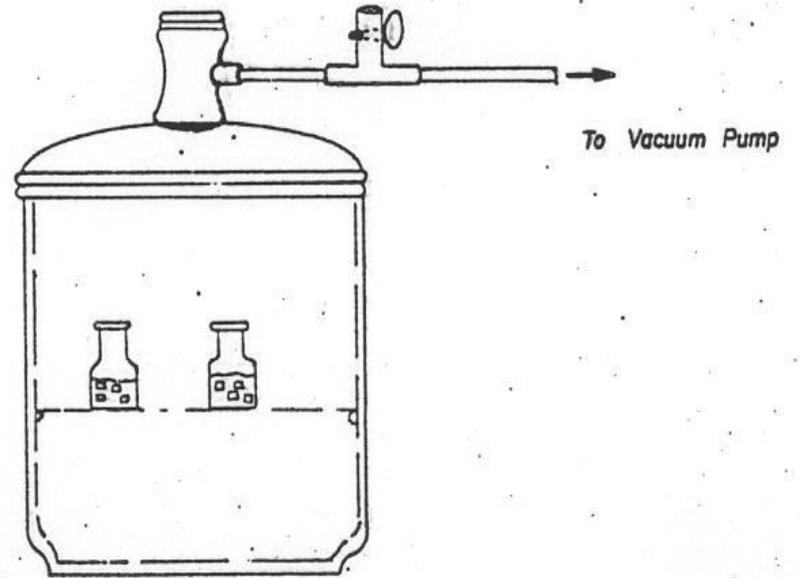
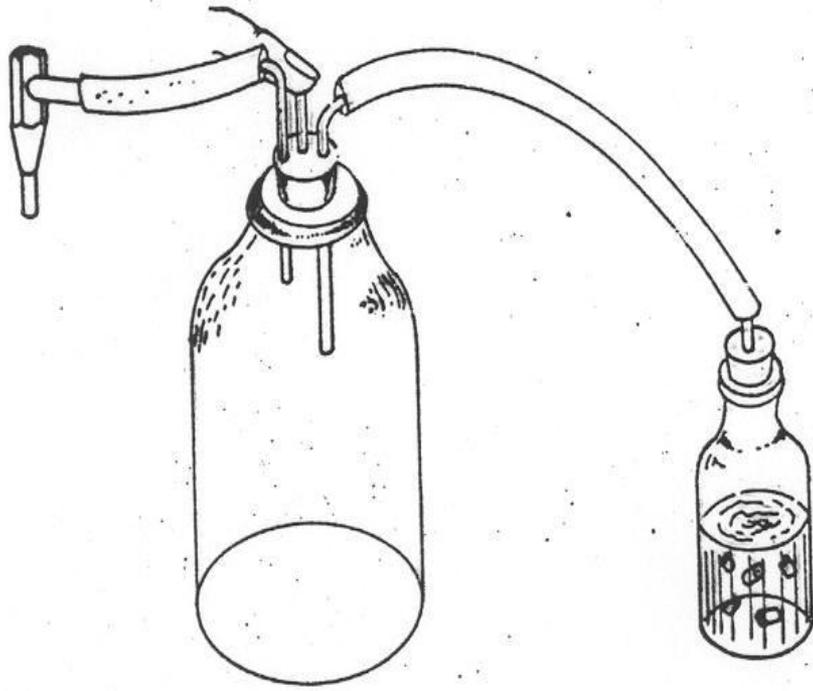
• 5. 매우 단단한 목재 고정방법

- 연구하려는 재료가 목재(wood)처럼 단단하여 cutting 이 잘 안될 때 사용. 이런 경우 부드럽게 하는 agent (Softing agent)를 고정 후에 처리할 것.
- Softing agent ; 불화수소(HF, Hydrofluoric acid) : 목화된 조직을 연화시킴. 먼저 고정(FAA)한 후에 HF 처리할 것.
- HF : D.W. = 1 : 2 용액에서 1-2 day 처리 후 tap water (1hr), 플라스틱 기구 사용(유리나 금속성 물질은 부식됨)
- 아주 dry woods는 고정 -> 끓는 물로 boiling 한 후 -> vacuum -> HF 처리.

제3절. 탈기 (Aspiration)

- 1) Air remove by use of the aspirator or vacuum pump
- 2) Safety bottle을 반드시 사용해야 하며, city water가 직접 FAA에 들어가지 않도록 조심해야 한다.

- 3) Aspiration 은 FAA에 떠 있는 material이 완전히 가라 앉고 더 이상 air bubble이 나오지 않을 때까지 한다.
- 30분 정도 aspiration 시킨 후 flask를 냉장고에 보관시킨 후 다시 몇시간 후에 aspiration 시킨다. Fixation을 시키는 시간 동안 계속 반복하여 완전히 air bubble을 material 안에서 제거시킨다.
- 4) 고정시간 내에 완전히 aspiration이 되지 않은 재료나 의심이 되는 material은 G4 (pure xylene)에서 여러 번 한다.



< 탈기하는 방법 >

Degassing with aspirator or with vacuum pump 3 times (30 min/each) a day

