

한국전자현미경학회지 제9권 제1호 1979.
Kor. Jour. Electron Microscopy, Vol. 9, No.1, 1979.

면역 전자 현미경 검사

가톨릭의과대학 병리학교실

최진

Immune Electron Microscopy

Jin Choe

Dept. of Pathology, Catholic Medical College, Seoul, Korea

서론

광학현미경 수준에서의 형광항체법이 발견된 이후 그 원리를 전자현미경 수준까지 발전시킨 ferritin 항체법이 1959년 Singer¹에 의하여 처음 개발된 이래 여러가지 방법으로 많이 이용되어 왔다².

그러나 이법은 ferritin 분자가 너무 커서 결합항체의 세포, 조직내 침투가 힘들다. 그것을 피하려고 수은³, 우도⁴, uranium⁵ 표시법등이 고안되었으나 역시 여러가지 난점으로 인하여 실용화하지 못하였다.

그중 ferritin 항체법만은 많이 이용되고 있으며 그 장점은 ferritin 입자가 항체분자와 등 mol 결합을 하므로 시료내에서 정확히 항원항체반응이 일어나는 한 전자현미경 사진상에서 항원의 정량적 취급이 가능한 것과 ferritin 입자의 전자확산력이 강하여 전자현미경 사진상에서 contrast 가 선명하여 항원국제부위의 판정이 정확하다는 것이다.

한편 효소표지항체법이 1966년 Nakane⁶ 등에 의하여 창시된 이후 널리 보급 되었다.

일반적으로 표지항체법이 면역전자현미경법으로써 이용되는데 필요한 조건을 보면 다음과 같다.

1. 표지물질자신 또는 표지물질의 조직화학반응으로 생긴 최종산물이 전자현미경적으로 검출가능한 contrast 를 나타내어야 한다.

2. 분자량이 적어서 표지항체로서 세포내 침투가 가능하여야 한다.

3. 항체와 표지물질결합에 있어서 항체가 가능한 한 보존되어 항원과의 결합이 가능하여야 한다.

이런 관점에서 ferritin 항체법과 효소항체법을 비교해서 보면 ferritin 분자는 분자량이 40~70 만, peroxidase 는 4 만이다.

ferritin 의 경우 항체 1 분자에 결합되는 철의 원자수는 약 2000(Fe 의 원자량 56 으로부터 Fe 만으로 112,000 로 된다), peroxidase 의 경우 항체 1 분자당 peroxidase 가 1 분자 내외이므로 각각 표지항체의 분자량의 차는 극히 커서 조직내 침투가 용이하다.

contrast 에 관하여 비교하여 보면 중금속 즉 Hg, Fe, U, I 등을 표지하는 immuno-metaloglobulin 법에서는 절편의 contrast 가 아주 낮아서 절편의 중금속에 의한 전자염색은 물론 osmium 산 고정조차도 할 수 없는 정도이고, 또 검경시 전자선에 의한 표지 중금속의 승화로 실용이 힘들다.

contrast 에 의한 표지항체의 인식이라는 점에서 ferritin 항체법과 peroxidase 항체법을 비교해 보면 ferritin 은 저장철로서 생합성되는 합철단백이며 절편의 전자현미경상에서는 Fe 를 포함하는 중심핵이 직경 약 50Å의 강 contrast 의 입자로서 인식된다. 이것은 고분해능사진상에서 또 몇개의 subunit 로 된다. 따라서 전자염색을 하지 않은 절편에서도 contrast 와 그 특유의 형태로 보여 인식이 가능하다.

한편 peroxidase 에서는 효소반응 최종산물의 contrast 를 검출하는 것으로서 일반적으로 기질로서 3-3' diaminobezidine 과 H₂O₂ 를 사용한다. 나중에 osmium 산 염색을 하므로 peroxidase-diaminobenzidine-OsO₄ 의 형태로서 볼 수 있다. 이것은 높은 contrast 를 얻을 수 있으나 절편에서 개개의 복합체 분자를 인식하지는 못한다.

또 peroxidase 법에서 methacrylate 수지에 포매후에 초박절후 탈포매하여 peroxidase 표지항체를 작용시킬 경우에는 세포내 투과성은 전혀 문제가 않된다.

본 론

1. peroxidase 항체법의 개략

A. 표지항체는 순도가 높고 항체활성이 높은 항체를 효소와 가능한한 온화한 조건하에서 결합시키고 그후 그것을 정제하여 비특이성 흡착이 적은 표지항체를 만들어야한다. 표지항체로서 현재 horseradish peroxidase 가 가장 흔히 사용되고 있으나 다른 효소도 사용될 수 있다.

B. 항원측에서 보면 조직세포의 미세구조와 항원활성을 모두 보존하면서 표지항체의 침투를 허용하는 고정조건을 찾아 내는 것이 필요하다.

2. 표지항체의 작성

A. 항체의 정제

효소항체법에 이용되는 항혈청은

- 1) 특이적이며 교차반응성이 없어야 한다.
- 2) 항체가 높아야 한다.
- 3) 항체가 안정해서 정제나 표지조작에 의하여 활성 상실이 적어야 한다.

이 항혈청은 황산암모늄 포화용액법으로 globulin을 얻는다, 그후 필요에 따라 DEAE-cellulose, Sephadex column chromatography 로 정제된 IgG 분획을 얻는다. 또 lyophilize 시켜서 분말로 보존하였다가 사용도 한다.

B. 효소의 조건

표지에 쓰는 효소는 효소활성이 안정되고 고순도의 것이 얻기 쉬워야하며 조직화학반응을 위한 효소기질도 얻기 쉬워야하고 조직화학반응의 최종산물이 확산하지 않고 전자선 불투과성이어야 한다. 현재 peroxidase 가 가장 많이 사용되고 acid phosphatase, alkaline phosphatase, glucose oxidase, tyrosinase, cytochrome 등이 사용된다.

C. 그전의 표지법

항체와 효소를 결합하는 2기반응성 시약으로서 p,p'-difluoro-m,m'-dinitrophenyl sulfone(FNPS) 또는 glutaraldehyde 가 사용되었다. 그 조작은 다음과 같다.

항체 globulin 용액(20mg/ml, 0.1 MPBS, pH7.0) 2ml 에 peroxidase 40mg 를 가해서 완전히 용해시킨다.

1% glutaraldehyde 수용액 0.1ml 를 적하하고 조용히 저으면서 실온에 2시간 반응시킨다. 이때 주의할 점은

- 1) 항체농도가 10mg/ml 이하인 때는 첨가하는 peroxidase 량은 항체량보다 1.5 배~3 배로 한다.
- 2) glutaraldehyde 적하량은 단백질량에 비례하는 것이 아니고 반응량에 비례시킨다. 예컨대 항체량이 1ml 인 때에는 0.05ml, 2ml 인 때에는 0.1ml, 3ml 인 때에는 0.15ml 이다.
- 3) pH는 중성부근(6.8~7.2)이면 된다.
- 4) 조용히 저어서 단백질 변성을 가급적 피한다.

표지한 뒤에는 50% 포화 황산암모늄 분획에 의하여 비결합효소와 분리한 것만으로도 사용이 가능하나, 비표지항체 및 항체 1분자당 과인의 효소가 결합된 표지항체가 혼재되어 반응의 감도가 저하되든가 비특이적인 반응이 일어날 수 있으므로 G-200, G-150, G-75 등 gel filtration 한 후에 사용함이 가하다.

표지항체의 항체활성 및 효소활성의 유지여부는 agar gel 내 면역확산법으로 침강선을 형성시킨 다음에 효소기질액에 담그어보면 특유의 색깔로 감별이 된다.

D. 최근의 표지법

그전에 glutaraldehyde 등을 쓴 표지 방법으로 IgG 는 보통 polymer 를 만들고 HRPO-IgG 로 결합되는 것은 대단히 적어서 첨가된 HRPO 의 5%이하만이 IgG 에 결합된다고 한다.

이렇게 결합이 적은 이유는 HRPO 에 있는 α 및 ε-amino 기 및 약간의 hydroxy 기가 allylthiocyanate 에 의하여 차단되어 결합에 이용되지 못하기 때문이라고 생각된다.

그래서 Kawaoi 와 Nakane 는 이에 대한 개량법을 고안하였다.

HRPO II 는 약 18%의 함유탄소를 가지고 있는 당단백인데 HRPO I 은 함유탄소를 거의 가지고 있지 않아도 그 작용은 HRPO II 와 비슷한 점으로 보아 함유탄소부분은 효소작용과 관계가 없는 것 같다.

이 HRPO II 부분을 NaIO₄ 로 산화하면 효소작용의 큰 상실없이 HRPO-aldehyde 가 생겨난다.

더구나 산화전에 HRPO 의 α 및 ε-amino 기와 hydroxy 기를 fluorodinitrobenzene(FDNB)으로 완전히 차단하면 HRPO-aldehyde 가 self coupling 하지 않고 α 또는 ε-amino 기가 있는 단백질과 schiff base 를 만들게 하는데 굉장히 효율이 높다.

1) FDNB 처리 :

FDNB 와의 작용은 0.3M sodium bicarbonate pH 8.1 에서 행하여진다.

즉 1ml의 sodium bicarbonate에 혼합된 5mg HRPO에 1 또는 5% FDNB ethanol 용액 10ml를 가하여 60분동안 노출시키면 HRPO 활성은 각각 35~50%까지 감소된다. 이것은 HRPO의 조기물질인 hydrogen fluoride가 생기는 까닭이다. 이것은 후에 투석하면 그 활성은 회복된다.

HRPO의 최대흡수파장은 403nm에서 이동하여 395nm에서 403nm 사이에 넓은 봉으로써 존재한다. 1 또는 5%에서의 HRPO의 RZ치(Reinheitszahl, 280nm에서의 absorbance에 대한 403nm에서의 absorbance의 비율)는 2.4(처치안한 것은 3.1)이다.

그래서 이후 1% FDNB를 사용하였다.

FDNB는 HRPO mol 당 2 lysine에 결합된다.

2) HRPO의 산화

FDNB로 처치한 HRPO를 NaIO₄로 산화하여도 장애가 없으므로 투석하기 전에 산화시킨다.

5mg의 FDNB로 처치한 HRPO를 증류수 1cc 당 0~0.16M NaIO₄로 30분동안 산화시킨 후 증류수에 탄 0.32M ethylene glycol 1cc를 가하여서 이 반응을 중단시킨다.

한시간 후에 0.01M sodium carbonate buffer, pH 9.5로서 그것을 투석한다.

HRPO를 산화하면 HRPO 활성과 RZ치가 떨어진다.

3) 결 합

HRPO-aldehyde 5mg를 lyophilize한 IgG(항체) 5mg에 3시간동안 작용시킨 후 phosphate buffer saline으로 투석하였다. 이것을 Sephadex G200분획을 모

아 280 및 403nm에서 그들의 absorbance를 결정한다. 그 결과를 표 1과 Fig. 1로 기재한다(Kawaoi 등에 의함).

HRPO 활성저하가 NaIO₄로 산화시키는 동안에 일어나지만 고농도로 오래동안 작용시키지 않는 한 투석한 후 IgG와 작용시키면 회복된다.

분광기로 검사하면 HRPO의 IgG에 결합되는 양은 NaIO₄ 농도를 높이고 작용시간을 길게하면 증가된다.

이에 반해서 HRPO의 효소활성과 IgG의 면역능은 떨어진다.

적절한 결합물은 0.08M NaIO₄로 30분간 산화하였을 때 일어날 수 있다.

4) sodium borohydride(NaBH₄)처치

HRPO-aldehyde와 IgG가 반응하여 만들어진 schiff base가 사용된다.

HRPO-IgG의 효소작용에 대한 여러가지 NaBH₄농도의 효과가 연구되었다.

이 결합물을 0~7mg/mg HRPO의 NaBH₄와 하룻밤 작용시켰다. 이것을 phosphate buffer saline로 투석 후 HRPO 활성을 검사하였다. 1~5mg/mg HRPO의 처리로서 82%의 HRPO 활성이 남아있었다. 7mg NaBH₄/mg HRPO를 사용하였을 때 활성저하가 심하다. 따라서 1mg/mg HRPO를 사용한다.

NaBH₄처치결합물은 대단히 안정하여 -20°C에 10mg bovine serum albumin/ml을 가하여 수개월동안 보존하여도 변화가 없다.

5) 포화점 결정

Table 1. Studies on the HRPO and IgG Activities during the Preparation of HRPO-IgG Conjugate

Oxidation Conditions		HRPO-Aldehyde		HRPO/IgG Mixture ^a		HRPO-IgG Peak ^b	
Duration (min)	NaIO ₄ concentration(M)	RZ ^c	HRPO activity ^d (percentage of original)	HRPO activity (percentage of original)	IgG activity ^e (percentage of original)	Absorbance at 403 nm (percentage of original)	HRPO activity (percentage of original)
30	0.00	2.44	100	102	100	1	1
30	0.02	2.31	94	101	98	22	21
30	0.04	1.97	89	100	98	49	47
30	0.08	1.55	68	98	92	73	68
30	0.16	1.25	57	80	57	81	63
60	0.02	1.97	91	95	100	36	36
120	0.02	1.70	86	98	102	58	55
180	0.02	1.51	62	88	95	62	52
240	0.02	1.31	56	79	59	68	43

a. Prior to chromatography on Sephadex G-200

b. After chromatography on Sephadex G-200

c. RZ, ratio of absorbance at 403 nm to absorbance at 280nm.

d. Measured spectrofluorometrically as described in the text.

e. Measured by immunoassay as described in the text.

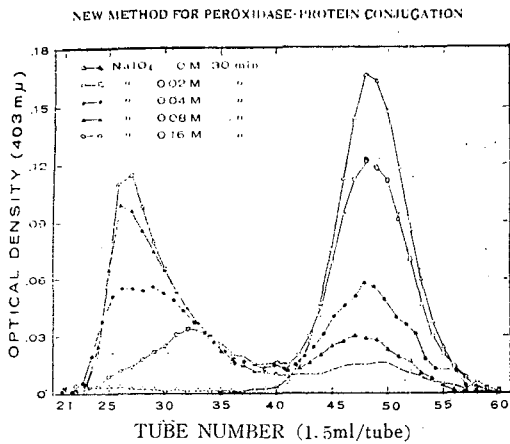


Fig. 1. Elution patterns of 3mg sheep antirabbit IgG immunoglobulin conjugated with 3mg HRPO activated by various concentrations of NaIO₄ for 30 min. The conjugates were chromatographed on a 92x 1.5-cm column of Sephadex G-200. Flow rate, approximately 5ml/hr. Eluant, PBS. Optical densities at 403 nm were measured in cuvettes with 0.5-cm path length.

항토끼 IgG 상의 HRPO-aldehyde 결합부위의 최대수를 볼 때 5~6 HRPO-aldehyde 가 IgG 입자에 붙을 수 있다. 그러나 4HRPO/IgG 이상의 것은 조직에 비특이적인 친화성이 있고 또 항체활성이 떨어져서 사용하지 못한다.

또 HRPO 여러 입자가 붙으면 결합물의 크기가 커져서 조직에 침투도 잘 안된다.

이상적으로 이야기하면 IgG 한 입자에 HRPO 한 입자가 붙고 면역학적 및 효소활성이 전혀 떨어지지 않는 것이 바람직하다. 그러나 실제적으로는 IgG 1mol 당 평균 HRPO 2mol 이 결합한 것(RZ 는 0.6) 이 IgG 의 면역능이 강하고 비특이적인 조직친화성이 없어서 아주 우수한 결합물이다.

6) 표지조작

실제로 표지하는데 필요한 것은 다음과 같다.

a) Horseradish peroxidase(Sigma 사의 Type IV, Boehringer 사 Grade 1, 일본동양방직의 peroxidase 1 호) 5mg.

b) 항체 globulin(동결건조분말~농도 1%이상의 용액)

c) 0.3M 중탄산 소다수용액 1ml.

d) 1%2,4-dinitro-fluorobenzen ethanol 용액 0.1 ml.

e) 0.08H NaIO₄ 수용액 1ml.

f) 0.16M ethylene glycol 수용액 1ml.

g) 0.01M carbonate buffer pH 9.5 약 4l.

h) NaBH₄ 5mg

i) BSA 30mg

j) 0.01M phosphate buffer saline pH 7.2 약 5l.

k) Sephadex G200 약 10g.

l) visking dialysing tube 평면폭 25mm정도의 것

m) magnetic stirrer

n) column chromatography 장치 일절(column 길이 70cm정도 직경 2cm 전후)

p) 분광 광도계

※완충액처방

0.01M carbonate buffer pH 9.5

A액 NaHCO₃ 3.36g

이것을 증류수에 녹여서 4l 로 한다.

B액 Na₂CO₃ 1.06g

이것을 증류수에 녹여서 1l 로 한다.

A액 4l 에 B액을 가해서 pH 를 9.5로 만든다

0.01M phosphate buffer saline

NaH₂PO₄·2H₂O 9.00g

Na₂HPO₄·12H₂O 64.54g

NaCl 160.00g

증류수에 녹여서 20l 로 한다.

pH 7.1~7.2 확인

※표지순서

(1) 소시험관에 0.3M 중탄산 소다수용액 1ml 를 취하고 peroxidase 5mg 을 가해서 녹인다. 용액은 갈색을 띠운다.

(2) 1% 2,4-dinitrofluorobenzenethanol 용액 0.1 ml 를 가해서 실온에서 1시간 magnetic stirrer 로 조 용히 켜는다. 용액은 황갈색으로 된다.

(3) 0.08M NaIO₄ 수용액 1ml 를 서서히 가하고 저어서 실온에서 30분간 반응시킨다. 용액은 녹색조 를 띠운다.

(4) 0.16M ethylene glycol 수용액 1ml 를 급속히 가하고 실온에서 1시간 켜는다. 용액은 다시 황색으 로 된다.

(5) 이상으로 활성화된 peroxidase 용액(전량 약 3.1ml)을 투석 tube 에 넣고 0.01M carbonate buffer (pH 9.5)중에서 4°C 24~28시간 투석시킨다.

(6) 투석 tube 에서 다시 소시험관에 넣고 이에 항 체 globulin 5mg(분말 또는 고농도의 용액)을 가하고 magnetic stirrer 로 저으면서 실온에서 3시간 반응시 킨다.

(7) NaBH₄ 5mg 을 가하고 4°C 에서 3시간 반응 시킨다.

(8) 다시 투석 tube 에 넣어서 phosphate buffer saline 중에서 24~28시간 투석한다.

(9) Sephadex G200으로 gel filtration 하여 결합되지 않은 peroxidase는 제거한다.

(10) 표지항체부분을 모아 4°C의 저온에서 3ml까지 농축한다. BSA를 1%농도로 첨가해서 이것을 원액으로서 4°C에 보존한다.

※0.05% 과산화수소 3,3'-diaminobenzene (DAB)용액(Karnovsky액) 만드는 법

(1) 3,3'-diaminobenzene(free base 또는 4염산염) 20mg를 0.05M tris buffer pH7.6 100ml에 가하고 실온에 30분이상 magnetic stirrer를 사용해서 짓는다.

(2) 여과지를 사용하여 녹지않은 DAB를 제거.

(3) pH 7.6으로 조정한다(이것은 tris buffer의 B액으로 조절한다).

(4) 과산화수소원액(30%)을 0.1ml 취하고 증류수 0.5ml를 가하여 잘 혼합한다.

그 0.1ml를 pH조정이 끝난 DAB용액 100ml에 가하여 잘 혼합한다.

3. 전자현미경검사

peroxidase 표지법은 광학현미경 수준에서도 검사된다. 즉 조직의 paraffin 절편으로 또는 동결절편을 만들어서 형광항체법에서와 마찬가지로 직접법 또는 간접법으로 조직내의 항원등을 염색할 수가 있다. 뿐만 아니라 이법은 전자현미경검사에도 응용될 수가 있다.

그 조작은 다음과 같다.

(1) 고정

(a) 1% formaldehyde 4°C 2시간 pH 7.4

(b) phosphate buffer saline 중에서 하룻밤 세척

(2) peroxidase 결합물과 작용

(a) 얇은 조직을 4°C에서 24~28시간 작용

(b) phosphate buffer saline으로 세척 4°C, 24시간

(3) 후고정 1

(a) 2.5% glutaraldehyde 4°C 30분 고정

(b) phosphate buffer saline에서 1시간 세척

(4) 염색

(a) 3,3' Diaminobenzidine 및 H₂O₂ 용액중에 10~30분 작용

(b) phosphate buffer에서 세척 1시간

(5) 후고정 2

1% OsO₄ 용액중 4°C 30~60분간 고정

(6) 냉 ethanol중에서 탈수

(7) 포매

(8) 박질 검사한다.

필요에 따라 negative stain을 한다.

4. 효소항체법에 관련된 여러가지 방법

A. 효소를 그대로 또는 단백질과 결합 후 동물에 주사하여 그 대사과정을 추적하는 방법^{7,8,9}, 효소 그대로 또는 ³H와 결합주사하여 retrograde transport를 보아 신경의 연결과 신경세포의 기원을 결정하는 방법¹⁰⁻¹², 항효소항체를 물질대사의 tracer로 사용하는 방법¹³이 있다.

B. 효소를 항원으로 면역하여 항체생산세포를 연구하는 방법에서^{14,15} 항원으로 사용한 효소를 검출함으로써 항원섭취세포의 동정(同定)이 가능하고 이 항원으로 생긴 항체는 동정된 세포에 항원으로 쓴 효소를 반응시켜서 생긴 항원항체 복합물의 조직화학적반응을 붉은색으로 검출이 가능하다. 같은 목적으로 단백질항원으로 면역후에 항체생산세포에 효소표지한 항원단백을 반응시키는 방법¹⁶도 있다.

C. 효소-항효소결합물(peroxidase-antiperoxidase complex)을 표지시켜서 항원을 찾는 방법¹⁷에서 항원으로 토끼에서 만든 항체를 부착시키고 그 토끼 Ig(항체)에 양에서 만든 항토끼 Ig 항체(antirabbit IgG)와 효소-항효소결합물을 가하면 항토끼 IgG의 한쪽에는 토끼 IgG가 붙고 다른 한쪽에는 효소-항효소결합물이 붙어서 그 항원을 동정할 수가 있다.

D. hybrid antibody법은 목적으로 하는 항원에 대한 항체와 이것과 같은 종류의 동물에서 만든 효소에 대한 항체와의 양자간의 hybrid 입자를 만들어서 조직내 항원과 작용시킨 후 여기에 효소를 작용시키면 그 항원부위를 검출할 수가 있다. 이 방법의 이점은 항체와 효소 표지과정에서 항체가의 저하 및 분자량의 증가를 피할 수가 있다는 점이다.

총 합

peroxidase 표지법에 관하여 기재하였는데 마지막으로 그 응용에 관하여 생각해보면 정상 또는 병적 상태에서의 면역 globulin 생산에 관한 문제^{15,16,18}, virus 항원의 세포내 국재, virus 발암에 있어서 종양 특이항원의 동정과 국재에 관한 것¹⁹⁻²¹ 세포내 내부항효소의 국재 및 산성세포동정^{7,22,23}, T세포의 동정²⁴ 자가면역질환의 연구²⁵ 등등 여러가지 방면에서 이용되고 있다.

마지막으로 주의할 것은 조직내의 과립백혈구, 적혈구, 대식세포등에 있는 내인성 효소활성도 특이반응과 같이 양성으로 나오는 점이다.

References

1. Singer, S.J.: Preparation of an electron-dense antibody conjugate. *Nature*, 183 : 1523, 1959.
2. Andres, G. A., Hsu, K.C. & et al.: Immune ferritin technique for the identification of antigens by electron microscopy. in Hand Book of experimental immunology, edited by D.M. Weir. Blackwell, 1967.
3. Pepe, F.A.: The use of specific antibody in electron microscopy. I. Preparation of mercury labelled antibody. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11 : 515, 1951.
4. Mekler, L.B., Klimenko, S.M. & et al.: Cytochemical and immunochemical analysis at the electron microscopic level: Obtaining contrasting antibodies by use of iodine. *Nature*, 20 : 717, 1964.
5. Sternberger, L.A., Donati E.I. & et al.: Electron microscopic study on specific protection of isolated Bordetella bronchiseptica antibody during exhaustive labelling with uranium. *J. Histochem. Cytochem.* 11 : 48, 1963.
6. Nakane, P.K. & Pierce, G.B.: Enzyme-labelled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14 : 929, 1966.
7. Kawarai, Y. & Nakane, P.K.: Localization of tissue antigens on ultrathin sections with peroxidase-labelled antibody. *J. Histochem. Cytochem.* 17 : 191, 1969.
8. Graham, R.C. Jr., Limpert, S. & et al.: The uptake and transport of exogenous proteins in mouse liver: Ultrastructural cytochemical studies with peroxidase tracers. *Lab. Investigation* 20 : 298, 1968.
9. Sedar, A.W.: Uptake of peroxidase into the smooth-surfaced tubular system of the gastric acid-secreting cell. *J. Cell. Biol.* 43 : 179, 1969.
10. Kim, C.C. & Strick, P.L.: Critical factors involved in the demonstration of horseradish peroxidase retrograde transport. *Brain Research*, 103 : 356, 1976.
11. Geisert, Jr. E.E.: The use of tritiated horseradish peroxidase for defining neuronal pathway: A new application. *Brain Research*, 117 : 130, 1976.
12. Lamb, A.H.: Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase for determining motor projection patterns to the developing limb in *Xenopus*. *Brain Research*, 134 : 197, 1977.
13. Kraehenbuhl, J.P. & Campiche, M.A.: Early stages of intestinal absorption of specific antibodies in the new born: An structural cytochemical and immunological study in the pig, ant rabbit. *J. Cell. Biol.* 42 : 435, 1969.
14. Leduc, E.H.: Avrameas, S. & et al.: Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cell. *J. Exp. Med.* 127 : 109, 1968.
15. Ternynck, T., Rodrigot, M. & et al.: Kinetics of antibody and immunoglobulin producing cells appearing in popliteal lymph nodes of mice stimulated with horseradish peroxidase. *J. Immunol.* 119 : 132, 1977.
16. Avrameas, S. & Bouteille, M.: Ultrastructural localization of antibody by antigen labelled with peroxidase. *Exp. Cell. Res.* 53 : 166, 1968.
17. Sternberger, L.A., Hardy, Jr. P.H. & et al.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. & Cytochem.* 18 : 315, 1970.
18. Suzuki, I., Takahashi, M. & et al.: Ultrastructural study of human myeloma cells in relation to its function. *J. Clinical Pathol.* 23 : 339, 1970.
19. Abelson, H.H., Smith, G.S. & et al.: Use of enzyme-labelled antibody for electron microscope localization of lymphocytic choriomeningitis virus antigens in infected cell culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 42 : 497, 1969.
20. Leduc, E.H., Wicker, R. et al.: Ultrastructural localization of SV40 T antigen with enzyme labelled antibodies. *J. Gen. virol.* V 4 : 465, 1969.
21. Wicker, R. & Avrameas, S.: Localization of virus antigens by enzyme labelled antibodies. *J. Gen. Virol.* 4 : 465, 1969.

22. Nakane, P. K.: Simultaneous localization of multiple antigens using the peroxidase-labelled antibody method: A study on pituitary glands of the rats. *J. Histochem. Cytochem.* 16 : 577, 1968
23. Nakane, P.K.: Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 18 : 9, 1970.
24. Schmit, D.: Ultrastructural identification of human tonsil T-lymphocytes by peroxidase-conjugated anti HTLA serum. *Experientia*, 32 : 1208, 1976.
25. Benson, M.D.: Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann. Int. Med.* 73 : 943, 1970.
26. Nakane, P.K. & Kawaoi, A.: Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22 : 1084, 1974.