

변조 레이저 빔을 이용한 세포 용액의 국소 열처리 기술

Local thermal treatment of a cell solution using a modulated laser beam

포항공과대학교 기계공학과 홍중간, 김동식

포항공과대학교 생명과학과 박영환, 황일두

I. 서론

온도의 변화는 생물체가 가장 민감하게 반응하는 환경 요소로서 끊임없는 외부의 온도 변화에 적응하기 위해 생물체는 다양한 대처 기작을 발달시켜왔다 특히 식물체는 능동적으로 주위의 환경으로부터 회피할 수 없어 적극적으로 온도 변화에 대응하여 생존하기 위해 복잡한 대응 방안을 진화적으로 발전시켜 왔다 이러한 대처기작이 규명되면 식물체의 생명현상을 이해하는데 중요할 뿐만 아니라 식물체의 재배 면적을 넓혀 생산성을 증가시키는 데도 유용하게 응용될 수 있다 따라서 오늘날 생체에 영향을 미치는 여러 환경 인자 중 온도 변화에 따라 생명 현상을 분석하는 연구는 많이 진행되고 있다^{1,2)} 그러나 세포 수준에서의 온도 변화에 대한 반응 연구는 공간, 시간적으로 정확한 온도 변화를 주기 위한 기술의 제약으로 인하여 효과적인 연구를 수행하는 데 한계성을 드러냈다 생체 시료는 보통 많은 수분을 함유하므로 열의 확산이 커서 정밀한 국소 가열이나 온도 계측에 어려움이 있기 때문이다 한편 연속파 레이저를 펄스 형태로 변조하여 시편을 가열하는 연구는 레이저를 이용한 열물성 측정^{3,4)}, 용접⁵⁾과 같은 분야에서 많이 이용되어지고 있다 연속파 빔을 펄스 형태로 변조하면 열침투 깊이를 효과적으로 줄일 수 있어 국소 가열이 이루어질 수 있다 본 연구는 변조된 레이저 빔을 이용하여 세포 크기 수준의 국소 열처리 기술 개발의 가능성을 규명하는 것을 목표로 한다 세포 용액을 가열하기 위한 기반 연구로서 세포 용액의 세포의 농도에 따른 흡광성을 조사하는 연구를 수행하였으며 레이저 빔 변조 특성에 따른 세포 용액의 온도 분포 미세 제어 가능성을 확인하는 연구를 수행하였다 또한 선행 연구로서 어느 정도의 열적 스트레스에 애기장대 식물 세포가 반응을 보이는 지를 알아보는 실험을 수행하였다

II. 실험방법

1 세포 용액의 흡광 특성 측정

세포 용액을 국소적으로 가열하기 위해서는 레이저 조사 시 광침투깊이를 최대한 짧게 해야 불필요한 열의 확산을 최소화 할 수 있다 광침투깊이를 최소화 할 수 있는 레이저를 선택하기 위해서 세포 용액의 파장별 흡광 특성을 알아보는 실험을 수행하였다 세포 용액의 성분은 Table 1 과 같다 세포 용액 속의 세포 농도를 달리하여 자외선/가시광선 분광기와 석영 큐비트($t = 2 \text{ mm}$)를 이용하여 파장별 흡광 스펙트럼을 측정하였다

2 변조된 CO₂ 레이저 빔을 이용한 시편 국소 가열 실험

세포 용액의 대부분을 차지하는 성분이 물이기 때문에 물이 세포 용액과 열물성 조건이 비슷하다고 가정할 수 있다 우선 물을 세포 용액 대신 시편으로 사용하기 위해 검증 실험을 수행하였다 100 μl 의 물과 세포 용액을 각각 튜브에 담은 후 집속하지 않은 CO₂ 레이저 빔(파장 10.6 μm)으로 똑같이 가열하였다 튕의 지름이 60 μm 인 E-type 정밀 열전대를 튜브의 중앙에 각각 담은 후 온도 변화를 관찰하고 두 결과를 비교하여 세포 용액의 열물성을 검증하였다

Table 1 Composition of a cell solution

Cell(Arabidopsis, protoplast)	2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 3×10^6 #/ml
Mannitol	0.5 M
MES	4 mM, pH 5.7
KCl	20 mM
Base fluid	water

변조된 CO₂ 레이저 빔으로 가열한 물 표면의 온도 분포를 측정하기 위한 실험 장치는 Fig 1과 같다. 시편이 되는 물을 지름이 10 cm인 유리 수조에 1 cm 깊이로 담았다. 연속파 CO₂ 레이저 빔을 AOM(acousto-optic modulator)을 이용하여 펄스 폭과 주파수를 변조하여 물에 조사하였다. 공급 파워는 60 mW로 항상 일정하게 유지하였다. 국소 가열을 위한 최적 변조 모드를 알아내기 위해 펄스 폭을 주기의 반으로 유지하고 주파수를 10 Hz, 100 Hz로 변조하는 실험과 주파수를 10 Hz로 유지하고 펄스 폭을 50, 15, 10 ms으로 변조하는 실험을 수행하였다. 볼록 렌즈($f = 50$ mm)로 집속시켜 약 300 μ m 지름의 레이저 빔을 물에 조사하였다. 온도를 읽기 위해서 열전대를 3축 마이크로 이송 장치에 부착하여 원하는 시편의 위치에서 온도를 읽을 수 있도록 설치하였다. 열전대는 전선의 두께가 25 μ m이고 팁의 지름이 60 μ m인 E-type으로서 시상수가 2 ms로 본 연구의 온도 변화를 읽기에 충분한 반응 속도를 가지고 있다. 빔이 조사되는 위치에서 시작하여 50 μ m 간격으로 열전대를 움직이며 표면 온도의 변화를 읽었다. 각 지점에서 진동하는 온도값을 데이터 로거를 이용하여 랜덤하게 100 번을 읽어들이며 각 지점에서 평균 온도값을 정하였다. AOM을 제어하는 변조 신호에 동조된 함수발생기의 신호와 100 배 증폭된 열전대 신호를 lock-in 증폭기에 연결하여 진동하는 온도의 진폭을 측정하였다.

3 애기장대 식물 세포의 열적 스트레스에 대한 반응 연구

어느 정도의 열적 스트레스에 애기장대 식물 세포가 반응을 보이는 지를 알아보기 위해 luciferase 보고자 유전자를 애기장대 식물 세포에 도입(transfection)하였다. 애기장대 원형질체

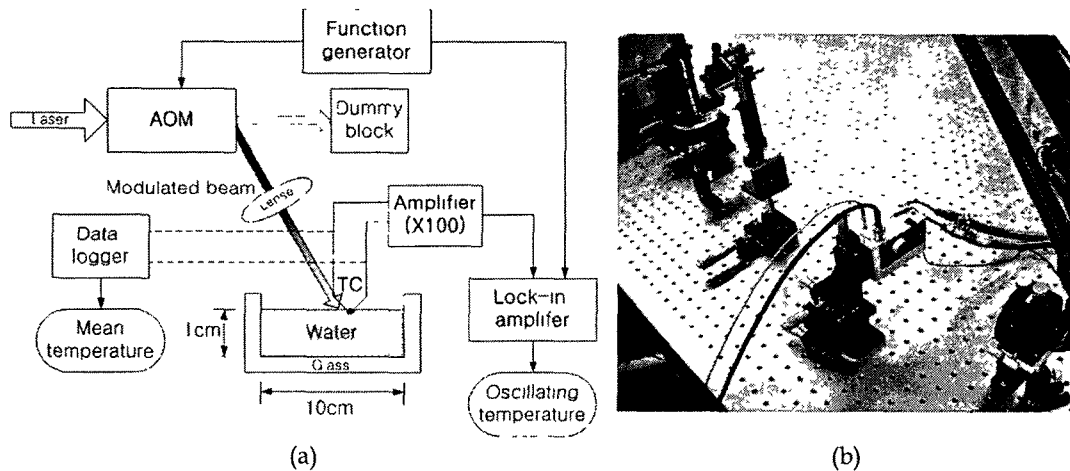


Fig 1 Experimental setup for local heating (a) schematic diagram of the setup and (b) a photograph

(세포벽이 없는 식물 세포)를 애기장대 식물로부터 분리해 낸 후 2×10^4 개 단위로 개체군을 만들어 20 μg 의 luciferase 보고자 유전자와 UBQ10-GUS 대조군 유전자를 원형질체에 도입하였다. 식물 세포가 스트레스를 받으면 스트레스 호르몬의 일종인 ABA 호르몬을 분비하게 된다. 이 때 luciferase 보고자 유전자가 도입된 세포는 ABA 호르몬과 반응하여 luciferase 단백질을 만들어 낸다. Luciferase 단백질은 luciferin 기질과 만나면 발광하므로 이 발광도를 측정하여 세포의 스트레스 반응 정도를 확인할 수 있다. 하지만 도입의 효율이 일정하지 않으므로 UBQ10-GUS 대조군 유전자를 같이 발현시켜 매 실험마다 발생하는 결과값의 변동 오차를 대조군에 대한 상대값으로 나타냄으로써 보정하게 된다. 도입이 끝난 세포들을 아무 자극을 주지 않은 것(상온), ABA 호르몬을 인위적으로 가한 것(상온), 30 $^{\circ}\text{C}$ 항온조에 넣어두는 것으로 나누어 시간대별로 최대 4 시간까지 배양한 후의 luciferase 발현 여부를 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 세포 용액의 흡광 특성

세포 용액의 세포 농도에 따른 흡광 계수를 구하였다. Fig 2는 각 레이저 파장별로 세포 농도에 따른 흡광 계수를 그래프로 그린 것이다. 세포의 농도가 짙어짐에 따라 흡광 계수가 증가하며 파장이 짧을수록 대체적으로 흡수가 잘 되는 경향이 나타났다. 파장인 248 nm인 excimer 레이저에서 가장 흡수가 잘 일어나며 근적외선인 Nd-YAG 레이저에서 비교적 흡수가 덜 일어난다. CO₂ 레이저의 파장인 106 μm 의 경우 세포 용액의 주성분인 물에 아주 강한 흡광성을 가지므로 문헌⁶⁾으로부터 물에 대한 흡광 계수 870 cm^{-1} 를 얻었다. 흡광성이 좋으면 광침투깊이가 매우 짧아져 레이저 국소 가열에 유리하다. 따라서 가장 농도가 짙은 세포 용액 (3×10^6 #/ml)의 흡광 계수와 문헌에서 얻은 CO₂ 레이저의 흡광 계수를 이용하여 매질 100 μm 를 통과하는 동안 흡수되는 빔의 흡수비를 식 (1)을 이용하여 계산하고 그 계산값을 Table 2에 나타내었다 (A · 빔의 흡수비, I_t · 투과 강도, I_0 · 조사 강도, κ 흡광 계수, y 광침투깊이)

$$A = 1 - \frac{I_t}{I_0} = 1 - e^{-\kappa y} \quad (1)$$

Table 2에서 보는 바와 같이 단위 세포 수준인 100 μm 길이에서 레이저 빔의 모든 에너지를 세포 수용액에 전달시키기 위해서는 CO₂ 레이저가 가장 적합함을 알 수 있다.

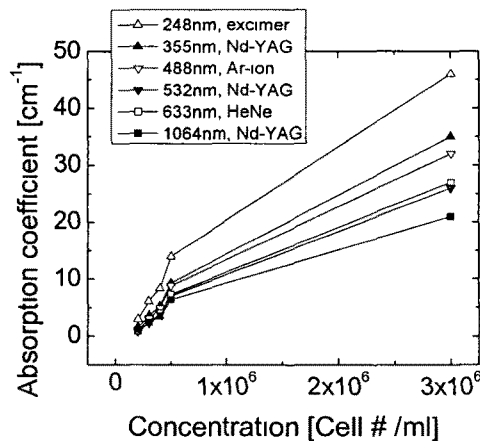


Fig 2 Absorption coefficient with cell concentration for various lasers

Table 2 Absorbance of the cell solution (3×10^6 #/ml) for various laser wavelengths (beam travel distance = 100 μm)

248 nm Excimer	355 nm Nd-YAG	488 nm Ar-ion	532 nm Nd-YAG	633 nm HeNe	1064 nm Nd-YAG	10.6 μm CO ₂
0.37	0.30	0.27	0.23	0.24	0.19	≈ 1

2 변조된 CO₂ 레이저 빔을 이용한 시편 국소 가열 결과

세포 용액 대신 물을 시편으로 사용하기 위한 검증 실험 결과는 Fig 3과 같다. 애기장대 식물의 열적 스트레스 범위인 30 ~ 35 °C 범위에서 물과 세포 용액의 온도 응답이 각각의 레이저 에너지 빔에 대하여 거의 흡사함을 알 수 있다. 따라서 실험이 용이한 물을 이용하여 레이저 빔 변조에 따른 시편의 온도 변화 특성 실험을 수행하였다.

Fig 4는 펄스 폭을 주기의 반으로 유지하고 변조 주파수를 10 Hz, 100 Hz로 달리 했을 때 물의 표면에서 생기는 온도 특성을 나타낸 그림이다. 레이저 빔의 파워는 주파수에 관계없이 60 mW로 일정하게 했다. 위치가 0인 지점이 레이저가 조사되는 지점이며 그로부터 50 μm 간

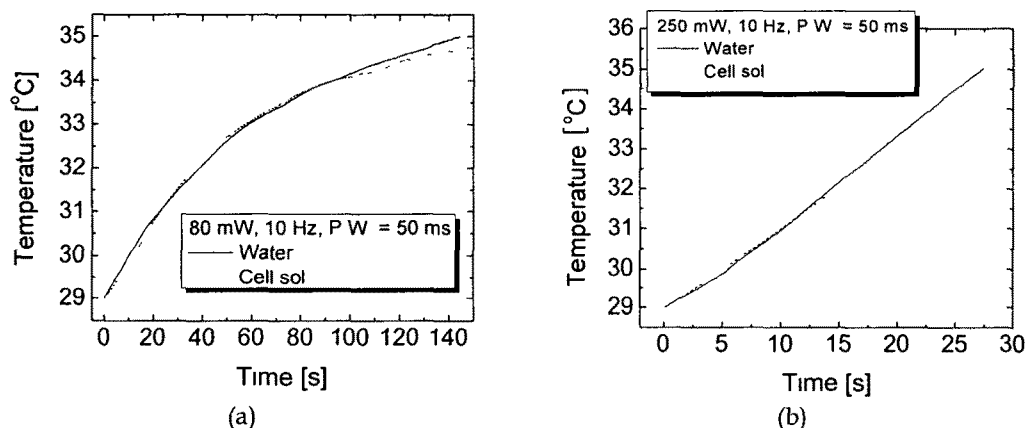


Fig. 3 Comparison of temperature response for water and the cell solution laser power = (a) 80 mW and (b) 250 mW

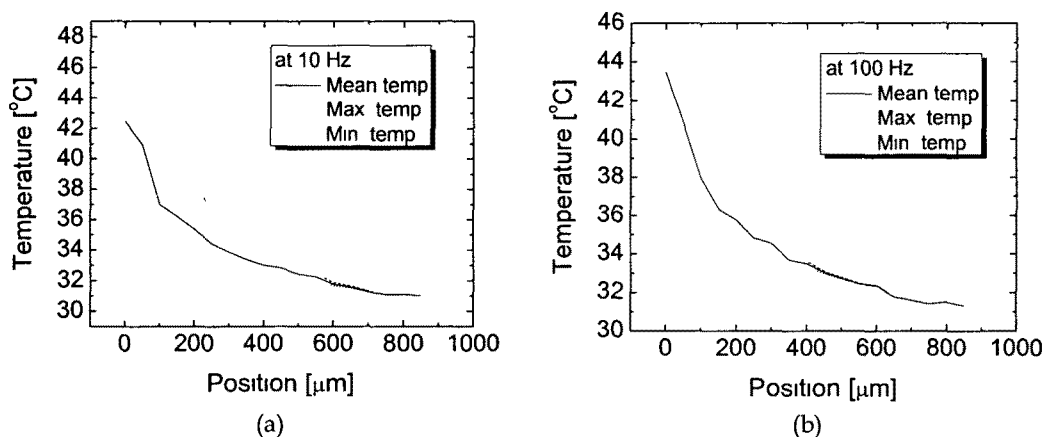


Fig 4 Spatial temperature profiles for two different modulation frequencies (a) 10 Hz and (b) 100 Hz

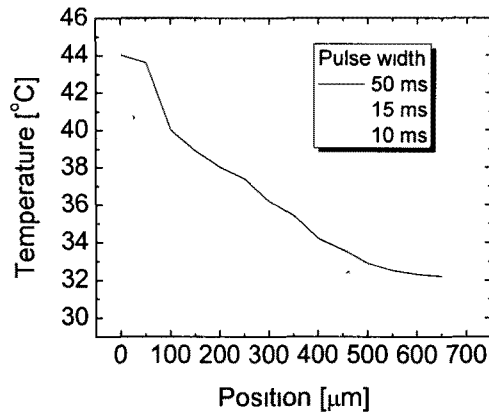


Fig 5 Mean temperature profile for various pulse widths (repetition rate = 10 Hz)

격으로 온도를 측정하였다 펄스파 형태의 CO₂ 레이저를 이용하여 가열을 하므로 평균 온도를 기준으로 최대 온도와 최소 온도 사이에서 온도가 진동하게 된다 온도 진동의 진폭은 주파수에 따른 열침투깊이와 관련이 있다 펄스 형태의 열원에 대한 매질의 열침투깊이는 $\sim\sqrt{\alpha/\omega}$ (α : 열확산도, ω : 변조 주파수)에 비례하게 된다 Fig. 4에서 보는 바와 같이 변조 주파수가 10 Hz에서 100 Hz로 증가함에 따라 진동하는 온도의 진폭이 더 작아지는 것을 볼 수 있다 따라서 변조 주파수를 높일수록 불필요한 온도의 진동을 막아 국소 가열에 유리함을 알 수 있다 비록 본 연구에서는 측정상의 문제로 100 Hz까지만 변조 주파수를 주었지만 그 이상의 변조 주파수를 이용하여 더욱 더 좁은 지역에서 온도의 진동이 생기도록 만들 수 있을 것이다

Fig. 5는 주파수를 10 Hz로 유지하고 펄스 폭을 50, 15, 10 ms로 달리 했을 때 물 표면에서의 평균 온도 특성을 나타낸다 펄스 폭은 각각 다르지만 레이저 빔의 파워는 모두 동일하게 60 mW로 일정하게 유지하였다 그림에서 보는 바와 같이 파워는 동일할 지라도 펄스 폭이 짧아질수록 평균 온도가 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있다 펄스 폭이 짧아지면 가열하는 시간이 짧아지기 때문에 열침투깊이($\sim\sqrt{\alpha t}$, α 열확산도, t 가열 시간)가 짧아지게 된다 따라서 동일한 파워, 주파수에서도 펄스 폭이 짧아질수록 열확산이 억제되어 국소 가열에 유리하다

Fig 4와 Fig 5와 같이 주파수는 크게 하고 펄스 폭을 줄여 열침투깊이를 효과적으로 줄일 수 있지만 단위 세포(100 μm)를 가열할 수 있을 정도로 열침투깊이를 줄이지는 못했다 빔의 지름이 약 300 μm 인 것이 가장 큰 문제이며 이 문제가 해결되면 수십 μm 의 열침투깊이를 가지도록 레이저 빔을 변조하는 것이 가능할 것이다

3 애기장대 식물 세포의 열적 스트레스에 대한 반응 연구 결과

Fig. 6은 대조 유전자의 발현에 대한 luciferase 보고자 유전자의 발현비를 나타내는 그림이다 이 발현비가 높을수록 식물 세포가 ABA 호르몬을 만들어 luciferase 단백질을 많이 생산해 냈음을 의미한다 Fig 6(a)와 같이 아무 처리 하지 않고 30 °C에서 배양한 개체와 상온에서 배양한 개체는 ABA 호르몬을 인위적으로 공급한 개체(상온 배양)보다 현저히 luciferase 단백질의 발현이 저조한 편이다 하지만 Fig. 6(b)와 같이 아무 처리하지 않고 상온에서 배양한 것과 30 °C에서 배양한 것만을 놓고 볼 때 시간이 지남에 따라 30 °C에서

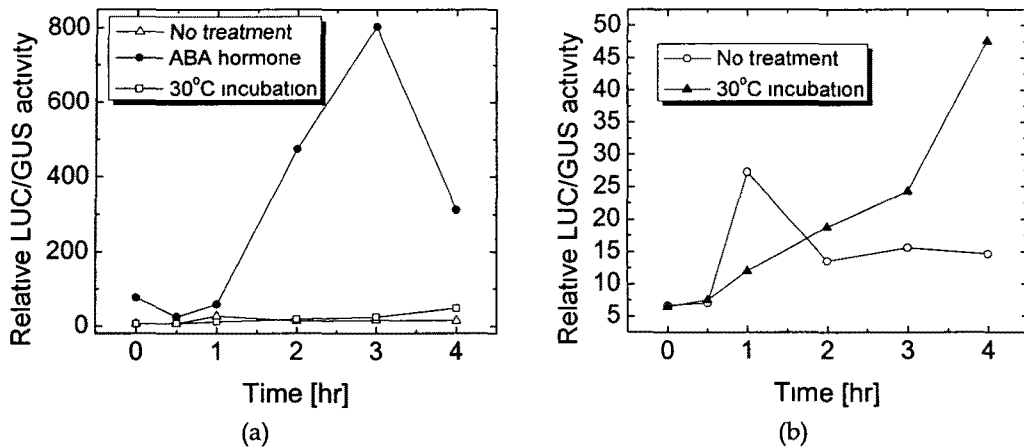


Fig 6 Temporal variation of relative LUC/GUS activity for three different incubation conditions The plot (a) shows all the results and (b) is for only two conditions.

배양한 개체가 luciferase 단백질을 점점 더 많이 발현하는 경향이 뚜렷이 나타난다 이 결과를 통해 ABA 호르몬을 직접 주입한 개체에 비해서는 현저히 떨어지지만 30 °C의 고온 환경(애기장대 생육의 적정 온도 21 °C)에서 애기장대 식물 세포가 스트레스 호르몬을 분비하고 luciferase 단백질을 계속 생산함을 알 수 있다. 이를 통해 레이저 빔 변조에 의한 세포 용액 열처리에서 온도 조건은 30 °C정도면 충분하며 열처리 지속 시간은 2~4 시간 정도가 적당할 것으로 판단된다

IV. 결론

본 연구는 식물 세포를 세포 크기 수준에서 국소 가열하면서 유전자 반응을 분석하기 위한 연구의 선행 연구로서 수행되었다. 먼저 식물 세포의 흡광 특성을 정량적으로 분석하기 위해 다양한 파장에 대한 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 한편 국소 가열을 위해 레이저 빔을 변조할 시, 주파수는 크게 하고 펄스 폭은 줄임으로써 효과적으로 열침투깊이를 줄일 수 있었다 따라서 집속된 빔의 지름을 줄이면 단위 세포를 국소적으로 가열하는 것이 가능함을 보였다 선행 실험으로서 애기장대 식물 세포의 열적 스트레스에 대한 반응 연구를 통해 30 °C에서 충분한 열적 스트레스 반응이 일어나며 열적 스트레스 환경이 2 ~ 4시간은 지속되어야 보고자 유전자의 발현을 관찰할 수 있음을 밝혔다.

후기

본 연구는 과학기술부 기초과학연구사업(특정기초연구) 지원으로 수행되었다.

V. 참고문헌

- 1 Thomashow MF · PLANT COLD ACCLIMATION Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol, 50, pp. 571-599, (1999)
2. Zhu J, et al : An Arabidopsis homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway, Proc. Natl Acad. USA, 29, pp 9873-9878, (2004)

3 Ichiro Hatta, et al Thermal diffusivity measurement of thin films by means of an ac calorimetric method, Rev Sci Instrum, 56, pp 1643-1647, (1985)

4 P K Wong, et al Thermal-diffusivity measurement of an oriented superconducting-film-substrate composite using the mirage technique, Physical Review B, 51, pp 523-533, (1995)

5 S Tsukamoto, et al : Development of high power CO₂ laser welding process, Science and Technology of Welding and Joining, 6, pp 363-367, (2001)

6 Markus W Sigrist, et al : Laser-generated stress waves in liquids, J Acoust Soc Am. 64, pp 1652-1663, (1978)