

이광자현미경 여기 광 파장에 따른 Arabidopsis thaliana 촬영 깊이 및 엽록체 형광 스펙트럼의 변화

주용준* · 손시형** · 김기현†

Variations of imaging depth and chloroplast emission spectrum of Arabidopsis thaliana with excitation wavelength in two-photon microscopy

Yongjoon Joo, Si Hyung Son, Ki Hean Kim

Abstract. Two-photon microscopy (TPM) has been used in plant research as a high-resolution high-depth 3D imaging modality. However, TPM is known to induce photo-damage to the plant in case of long time exposure, and optimal excitation wavelength for plant imaging has not been investigated. Longer excitation wavelength may be appropriate for in vivo two-photon imaging of Arabidopsis thaliana leaves, and effects of longer excitation wavelength were investigated in terms of imaging depth, emission spectrum. Changes of emission spectrum as a function of exposure time at longer excitation wavelength were measured for in vivo longitudinal imaging. Imaging depth was not changed much probably because photon scattering at the cell wall was a limiting factor. Chloroplast emission spectrum showed its intensity peak shift by 20 nm with transition of excitation wavelength from 849 nm or below to 850 nm or higher. Emission spectrum showed different change patterns with excitation wavelengths in longitudinal imaging. Longer excitation wavelengths appeared to interact with chloroplasts differently in comparison with 780 nm excitation wavelength, and may be good for in vivo imaging.

Key Words: Two-Photon Microscopy(이광자현미경), Arabidopsis thaliana (애기장대), in-vivo imaging(in-vivo 영상)

1. 서론

레이저 스캐닝 현미경은 식물 잎 줄기 등을 3차원 고해상도 영상화 할 수 있고 식물 내 세포 및 소기관을 관찰할 수 있어 식물의 동작 매커니즘 이해에 중요하다. 식물의 고해상도 3차원 영상에는 주로 공초점 레이저 스캐닝 현미경(confocal laser scanning microscopy, CM)이 활용되었다[1-2]. 공초점 현미경은 단광자 형광을 기반으로 식물 소기관의 자가형광이나 외부 형광체를 이용하여 관심있는 분자체를 형광 염색하여 영상 관찰하는 연구에 많이 사용되었다. 이러한 공초점현미경 이외에 이광자 형광을 기반으로 하는 이광자현미경(two-photon microscopy)도

식물연구에 활용되었다. 이광자현미경은 비선형 형광현상인 이광자 형광(two-photon excitation)을 기반으로 하는 3차원 형광 현미경 기술로, 단광자 형광에 비해 약 2배의 여기 광 파장을 사용한다. 이광자현미경은 일반적인 생체조직에서는 높은 촬영 깊이와 제한된 광손상으로 in vivo 생체조직 연구에 많이 활용되고 있다[3-9]. 반면에 식물에서는 이광자현미경의 활용도가 그리 높지는 않다. 식물은 조직 내부가 공기층을 포함하며 훨씬 더 불균질하여서 광수차와 광산란이 높게 발생하며, 엽록소 등이 여기 광을 흡수하여 광흡수도 높다. 그러므로 공초점현미경 보다 장파장의 여기 광을 사용하는 이광자현미경이 촬영깊이 면에서 장점이 크지 않다. 또한 이광자현미경에서

† 책임저자의 소속 포항공과대학교 기계공학과

E-mail : kiheankim@postech.ac.kr

* 포항공과대학교 융합생명공학부

** 포항공과대학교 기계공학과

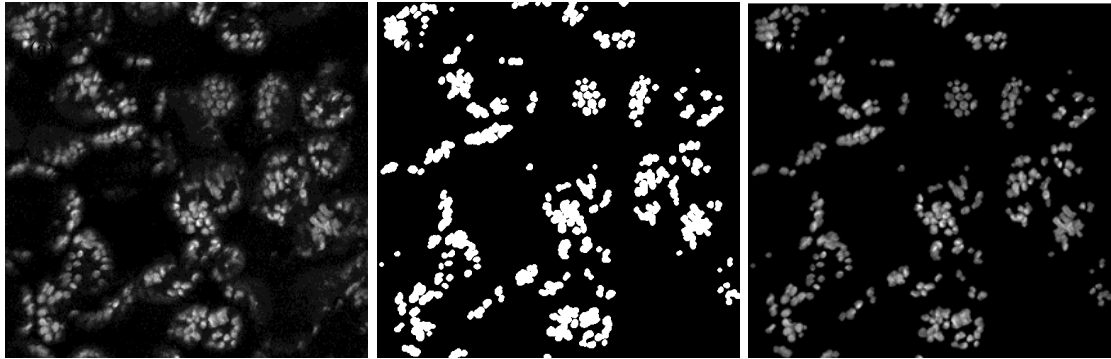


그림 1. (a) Raw data. (b) Binary image generated by thresholding. (c) Chloroplast signal only, (a)와 (b)를 곱해서 얻는다.

이광자 여기에 사용하는 펄드초 레이저는 엽록소에 높은 여기 광 플럭스에 의해 광손상을 더 많이 발생시키는 것으로 알려져 있다[10]. 하지만 그림에도 불구하고 이광자 현미경은 단광자 형광 기반 공초점현미경에 비해 식물에서 상대적으로 더 높은 촬영 깊이를 보였으며 in vivo 연구에도 활용되었다. 최근 굴절률 (refractive index) 매칭을 통해 산란도를 감소시켜 촬영 깊이 증대가 가능함이 보고되었고[11-13], 펄드초레이저 흡수에 의한 광 손상 또한 장파장으로 갈수록 줄어들 것으로 예상되어 이광자 현미경을 활용한 식물 연구가 가능할 것이다[14-15]. 또한 이광자 여기 현상은 단광자 여기 현상과 다른 여기 에너지준위를 밝힐 수 있으므로 엽록소 분자구조 연구에도 활용되었다.

본 연구에서는 기존 이광자현미경 식물연구에서 사용된 여기 광 파장인 780 nm에서 벗어나서 장파장 여기 광을 사용하여 영상 깊이를 측정해보았고, 이광자 형광 광을 분광 측정하여 장파장 여기 광에 따른 식물의 이광자 형광 반응에 대해 고찰하였다.

2. 실험방법

2.1 영상획득 시스템

사용된 이광자현미경은 라이카 TCS SP5 II 시스템으로 단광자 형광 기반 공초점현미경과 이광자현미경 기능이 함께 포함되어있다. 이를 활용하여 공초점현미경과 이광자현미경을 상호 비교할 수 있었다. 사용한 여기 광 파장은 공초점현미경의 경우 488 nm를 사용하였고, 이광자현미경의 경우 800 nm에서 1000 nm까지 50 nm 간격으로 바뀌가며 측정하였다. 사용한 실험조건은 대물렌즈의 아래로 평균 20 mW 파워, 촬영범위는 $300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$

m, 촬영속도는 프레임당 0.7초, 그리고 $2\mu\text{m}$ 깊이 단위로 촬영하였다.

2.2 식물 샘플

본 연구에서 사용한 식물은 *Arabidopsis thaliana*로 petri dish에서 배양된 2주 자란 것을 사용하였고 잎을 촬영하였다. 촬영하기 전에는 20분 이상 어두운 곳에 두었다. 식물 잎 촬영에는 식물 전체를 대물렌즈 앞으로 가져와서 가능한 한 in vivo촬영이 되도록 노력하였다.

2.3 엽록소 스펙트럼 측정을 위한 영상 획득 및 영상 처리

엽록소 형광 스펙트럼 측정에는 시스템의 분광측정기능을 사용하였다. 형광 광을 프리즘을 통해 분광시키고 슬릿을 통해 10 nm 대역으로 신호를 집중하게 하였으며 이 슬릿을 선형이동하면서 10 nm 단위로 분광 영상을 반복해서 획득하였다. 각 영상의 신호로부터 그래프를 그리면 형광 광 스펙트럼이 된다. 이 방법은 분광계 없이 형광 스펙트럼을 얻을 수 있지만, 한 스펙트럼을 얻는데 30초 정도 걸리기 때문에 시간에 따른 스펙트럼 변화를 관측하는 데에는 적합하지 않다. 그러므로 시간에 따른 스펙트럼 변화 측정에는 dichroic mirror와 필터로 형광 광을 분할하여 다중채널로 영상 측정하였다.

시간에 따른 영상 촬영에는 엽록체의 미세한 움직임에 의한 영향을 배제하기 위하여 z방향으로 약 6 마이크로미터 두께로 volume scan 하였고 이를 projection하여 1개 프레임으로 만들었다. 프레임 영상 데이터 분석에는 엽록체만을 분석하기 위하여 영상처리를 수행하였다(그림 1). 이는 여기 광의 파장이 짧을수록 백그라운드 신호가 강하

기 때문에 영상처리에는 노이즈 제거를 위해 사용하였다.

2.4 시간에 따른 이광자 형광 스펙트럼 변화 관측 방법

이광자현미경 촬영에 따른 펄스초레이저에 의한 광손상 현상은 기존에 형광 광 스펙트럼 변화로 측정되었다. 형광 광을 500 nm ~ 600 nm, 600 nm ~ 700 nm 2 채널로 나누어 분광 측정하였다. 기존의 연구에서 이광자현미경으로 같은 샘플영역을 연속 촬영하면 형광 광 스펙트럼이 초기에는 장파장 채널에만 신호만 있다가, 점차 단파장 채널에도 신호가 증가하면서 장파장 채널에서는 신호가 감소하는 것으로 관측하였고, 이 과정에서 엽록소의 손상을 확인하였다[16-17]. 본 연구에서도 이광자현미경 연속 촬영을 하면서 스펙트럼의 변화를 2채널 분광측정으로 관찰하였다. 여기 광 파장에 따른 차이를 관측하기 위해 여기 광을 800 nm부터 900 nm까지 바꾸면서 측정하였다.

3. 결과

3.1 촬영 깊이 비교

여기 광 파장 변화에 따른 이광자현미경 영상의 촬영 깊이 비교를 위해 같은 샘플 영역에서 800 nm 그리고 1100 nm 파장의 여기 광으로 3차원으로 촬영하였고, 이 중 x-z 단면에서의 엽록소 분포가 그림 2에 제시되었다. 밝은 초록색으로 보이는 것이 이광자 자기형광 광을 발현하는 엽록소들이고 이들은 세포벽을 따라서 분포하고 있는 것이 보인다. 800 nm 여기 광으로 촬영한 그림에서는 세포벽으로 둘러 싸여져 있는 하나의 세포 층이 보이고 그 아래에 있는 세포들은 보이지 않는다. 1100 nm 파장에서 촬영한 이광자현미경 영상에서도 표면에 있는 하나의 세포 층만이 관찰되고 그 아래의 세포들은 관찰되지 않는다. 여기 광 파장이 약 1.37배 다르지만 촬영깊이에서는 별로 차이가 나지 않는다. 그러므로 장파장의 여기 광을 사용함으로써 촬영깊이 면에서는 별로 차이가 없었다. 이는 촬영깊이가 일반적인 생체조직과는 달리 파장에 따라 달라지지 않는 것을 의미하며, 식물에서 특이적인 세포벽 그리고 공기층에 의한 굴절률 차이에서의 광산란에 의한 것으로 추정할 수 있다. 이러한 광산란은 파장에 따라 크게 차이가 없다.

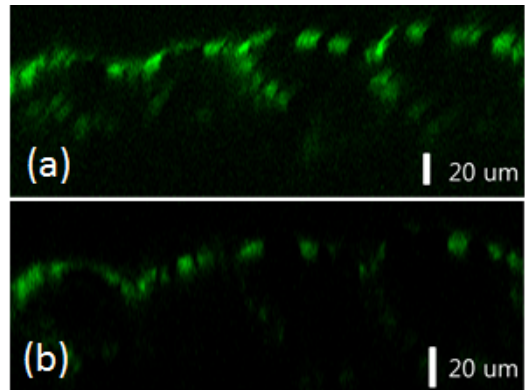


그림 2. 파장 변화에 따른 촬영 깊이 차이.

3.2 형광 스펙트럼 비교

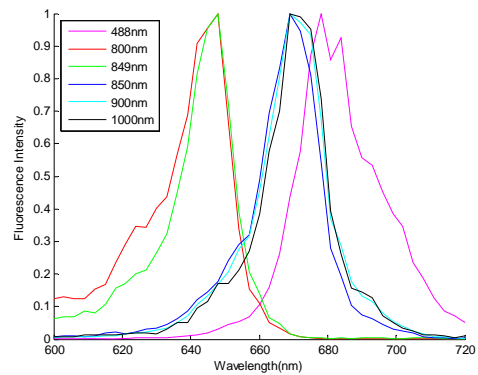
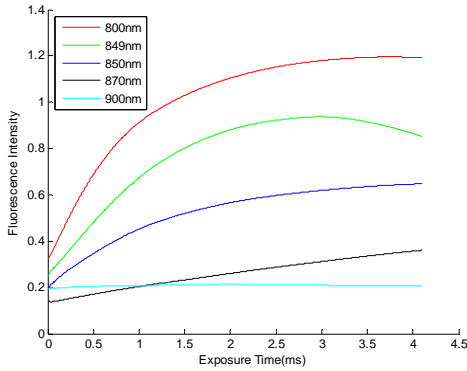


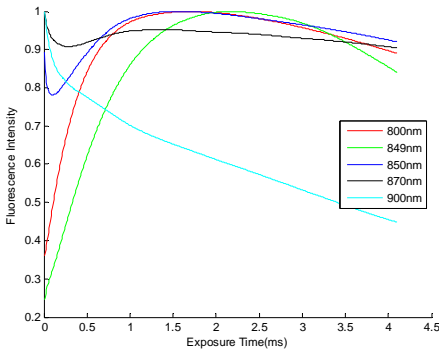
그림 3. 단광자 형광 스펙트럼과 이광자 형광 스펙트럼의 비교, 여러 다른 파장의 여기 광에 따른 이광자 형광 스펙트럼

여러 다른 파장의 여기 광을 이용한 엽록소에서 의 이광자 형광 스펙트럼 측정 결과를 그림 3에서 보았다. 기준으로 단광자 공초점현미경으로 측정된 엽록소 스펙트럼도 함께 포함되어 있다. 800 nm와 849 nm에서는 이광자현미경 형광 광 스펙트럼이 650 nm에서 피크를 가지는 것이 관찰되고 단광자 형광의 경우 형광 광 스펙트럼이 약 680 nm에서 관찰된다. 이들은 예전 논문의 자료와 일치한다. 반면에 여기 광 파장이 850 nm와 900 nm에서는 형광 광 스펙트럼의 peak가 약 20 nm 더 길어져 670 nm에서 관찰된다. 이는 단광자 여기에 의한 형광 스펙트럼 피크와도 차이가 난다. 이와 같은 이광자 형광 광 스펙트럼 피크 변화는 여기 광 파장이 849 nm에서 850 nm로 1 nm 차이에서도 발생하는 것이 관측되었다. 형광 광 스펙

펙트럼의 피크 변화는 이광자 여기, 형광의 에너지 준위가 단광자 여기, 형광의 것과 달라서 발생하는 것으로 보인다.



Green (500 nm ~ 590 nm)



Red (600 nm ~ 700 nm)

그림 4. 여기 광 파장에 따른 단파장 (초록), 장파장 (빨강) 채널에서의 이광자 형광 신호비교. 단파장 채널- 시간이 지남에 따라 신호가 증가하고, 여기 광 파장이 증가함에 따라 기울기가 감소한다. 장파장 채널- 850 nm 이하의 여기 광 파장에 대해서는 처음에 신호가 증가하고, 900 nm 이상의 파장에 대해서는 일정하게 감소한다.

3.3 시간에 따른 형광 스펙트럼 변화 관찰

이광자현미경으로 같은 엽록소 샘플을 연속 촬영하는 경우 펄스 레이저 여기 광에 의해 엽록소의 스펙트럼이 변화하는 것이 기존 연구에서 관찰하였는데 그 연구에서는 780 nm 파장의 여기 광으로 관찰하였다. 여기 광에 의한 영향은 흡수 스펙트럼과 연관있으며 파장에 따라 많이 차이가 나므로 본 실험에서는 장파장 여기 광

에서 관찰하였으며 결과가 그림 4에 제시되었다. 800 nm 여기 광의 경우 500 ~ 590 nm 대의 단파장 대역에서는 신호가 계속해서 증가하는 것이 관찰되었고 600 ~ 700 nm 장파장 대역에서도 신호 세기가 계속 증가하다가 감소세로 돌아서는 것이 관찰되었다. 비슷한 패턴이 849 nm 여기 광 파장에서도 관찰되었는데, 단파장 대역에서는 신호가 피크에 도달한 뒤 천천히 감소하기 시작했고 장파장 대역에서는 좀 더 긴 시간 후에 피크에 도달하는 것이 보였다. 여기 광 파장이 850 nm, 870 nm, 900 nm로 길어질수록 단파장 대역에서는 신호 증가 기울기가 점차 낮아졌고 900 nm에서는 신호가 일정하게 유지되었으며 반면에 장파장 대역에서는 850 nm와 870 nm 여기 광 파장에서는 신호가 초기에 감소하다가 상승하는 패턴이 보이다가 900 nm에서는 신호가 점차 감소하는 것이 나타났다. 단파장 대역에서 형광 광 신호가 발생하는 것은 단광자 여기에서는 전혀 발생하지 않고, 이광자 여기에서만 발생하는 현상으로 photobleaching 현상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 900 nm 여기 광 파장에서 단파장 대역의 형광 광 세기가 변화가 없고 그리고 장파장 대역에서는 신호 세기가 줄어드는 것은 photobleaching 현상이 발생하지 않거나 여기 광이 엽록소와 전혀 상호작용을 하지 않는 것으로 고려 될 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 식물연구에 많이 사용되는 *arabidopsis thaliana*의 in vivo 이광자현미경 영상촬영에서 여기 광 파장에 따른 촬영깊이와 엽록소의 형광 스펙트럼 변화를 관찰하였다. 촬영깊이는 여기 광 파장에 따라 별로 차이가 없었으며 오히려 장파장에서 촬영깊이가 낮은 것처럼 보였다. 이는 1100 nm에서는 이광자 여기가 800 nm 보다 낮아서 발생하는 것으로 보인다. 여기 광 파장에 관계 없이 촬영깊이가 일정하게 유지되는 것은 식물을 구성하는 세포벽 그리고 공기층 인터페이스에서 강한 광산란이 있기 때문으로 보인다. 이러한 광산란은 파장에 관계없이 일정하기 때문이다.

엽록소의 이광자현미경 영상촬영에서 여기 광 변화에 따른 엽록소 형광 스펙트럼의 변화와 같은 영역에서 이광자현미경 영상 촬영을 계속 진행하였을 때 형광 스펙트럼에서의 반응을 관찰하였다. 849 nm 이하의 여기 광의 경우 형광 광의 피크가 약 650 nm에 있었지만 여기 광이 850 nm 이상인 경우 형광 광 스펙트럼 피크가 650 nm로 shifting 하는 것이 관찰되었다. 이는 엽록소 구성물질의

에너지 준위와 관계 있을 것으로 예상된다. 같은 영역에서 이광자현미경 촬영을 진행하였을 때 형광 광 스펙트럼의 시간에 따른 변화도 여기 광의 파장에 따라 차이가 나타났다. 여기 광의 파장이 낮은 경우 500~600 nm 단파장 대역에서는 신호 세기가 점차 증가하는 것이 약 870 nm 여기 광 파장까지 보였으며 900 nm 여기 광에서는 변화가 나타나지 않았다. 반면에 600~700 nm 장파장 대역에서는 849 nm 이하 여기 광에서는 신호가 급격히 증가하다가 천천히 감소하는 경향이 보이고 850~870 nm 대역에서는 초기에 감소했다가 증가 후 일정하게 유지가 되는 경향, 마지막으로 900 nm 대역에서는 신호가 점차 감소하는 경향이 보였다. 특히 900 nm 대역에서는 전반적인 형광 신호에서도 감소세가 보이는데 이는 이광자현미경 영상 촬영이 엽록소에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

결론적으로 이광자현미경 여기광을 850 nm, 900 nm 등 장파장으로 사용하여 *arabidopsis thaliana*를 촬영한 경우, 단파장 여기광에 비하여 촬영깊이에서는 차이가 없었으나 이광자 형광 광 스펙트럼에서는 차이가 있었다. 단파장에서는 이광자현미경 촬영에 의해 광손상이 있는 것으로 보고 되었지만 장파장에서는 다른 반응을 보이므로 광손상이 줄어들 가능성이 있다.

참 고 문 헌

- Kate Maxwell, Giles N. Johnson, 2000, "Chlorophyll fluorescence - a practical guide", Journal of Experimental botany, Vol.51, No. 345, pp.659-668.
- Zuzana Benediktyová, Ladislav Nedbal, 2009, "Imaging of multi-color fluorescence emission from leaf tissues", Photosynth Res, Vol. 102, pp.169-175.
- Winfried Denk, James H. Strickler, Watt W. Webb, 1990, "Two-photon Laser Scanning Fluorescence microscopy", Science, Vol.248, pp.73-76.
- Peter T.C. So, Chen Y. Dong, Barry R. Masters, Keith M. Berland, 2000, "Two-photon Excitation Fluorescence Microscopy", Annu. Rev. Biomed. Eng 02, pp.339-429.
- Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, Watt W Webb, 2003, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences", Nature Biotechnology Volume 21, Number 11, pp.1369-1377.
- Goeppert-Mayer, M., 1931, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprungen", Annals of Physics 9 pp.273-294.
- S.P. Schilders and M. Gu, 2000, "Limiting Factors on Image Quality in Imaging through Turbid Media under Single-photon and Two-photon excitation", Microscopy and Microanalysis 6, pp.156-160.
- Peter TC So, 2000, "Two-photon Fluorescence Light Microscopy", Encyclopedia of Life Science, pp.1-5.
- Ping-Chin Chen, 2006, "Interaction of Light with Botanical Specimens", Handbook of Biological Confocal Microscopy, Third Edition, pp.414-441.
- Ping-chin Cheng, Bai-Ling Lin, Fu-jen Kao, Min Gu, Ming-Gun Xu, Xiaosang Gan, Mao-Kuo Huang, Yung-Shun Wang, 2001, "Multi-photon fluorescence microscopy - the response of plant cells to high intensity illumination", Micron 32, pp.661-669.
- George R. Littlejohn, Jessica C. Mansfield, Jacqueline T. Christmas, Eleanor Witterick, Mark D. Fricker, Murray R. Grant, Nicholas Smirnov, Richard M. Everson, Julian Moger and John Love, 2014, "An update: improvements in imaging perfluorocarbon-mounted plant leaves with implications for studies of plant pathology, physiology, development and cell biology", frontiers in PLANT SCIENCE, Vol. 5, Article 140.
- Littlejohn G. R., Gouveia J. D., Edner C., Smirnov N., and Love J., 2010, "Perfluorodecalin enhances in vivo confocal microscopy resolution of *Arabidopsis thaliana* mesophyll", NewPhytol. 186, 1018-1025.
- Littlejohn G. R., and Love J., 2012, "A simple method for confocal imaging of *Arabidopsis* leaves with perfluorodecalin as infiltrative imaging medium". J. Vis.Exp. 16.
- Fu-Jen Kao, Yi-Ming Wang, Jian-Cheng Chen, Ping-Chin Cheng, Rung-Wi Chen, Bai-Ling Lin, 2002, "Micro-spectroscopy of chloroplasts in protoplasts from *Arabidopsis thaliana* under single and multi photon excitations", Journal of Luminescence 98, pp.107-114.
- Fu-Jen Kao, Yi-Min Wang, Jian-Cheng Chen, Ping-Chin Chen, Rung-Wu Chen, Bai-Ling Lin,

- 2002, "Photobleaching under single photon and multi-photon excitation: chloroplasts in protoplasts from *Arabidopsis thaliana*", *Optics Communications* 201, pp.85-91.
- 16) Peter J. Walla, Jenny Yom, Brent P. Krueger, and Graham R. Fleming, 2000, "Two-Photon Excitation Spectrum of Light-Harvesting Complex II and Fluorescence Upconversion after One- and Two-Photon Excitation of the Carotenoids", *J. Phys. Chem. B*, Vol.104, pp.4799-4806.
- 17) Roberto Pedrós, Ismael Moya, Yves Goulas, Stéphane Jacquemoud, 2008, "Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf", *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol. 7, pp.498-502..