



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0070407
(43) 공개일자 2025년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/0098 (2013.01)
G01N 2333/415 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0156572

(22) 출원일자 2023년11월13일
심사청구일자 2023년11월13일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

가천대학교 산학협력단

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
(뒷면에 계속)

(72) 발명자

이충엽

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공학관 402호

서채영

충청남도 천안시 서북구 두정역동1길 12, 유엔아이 401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

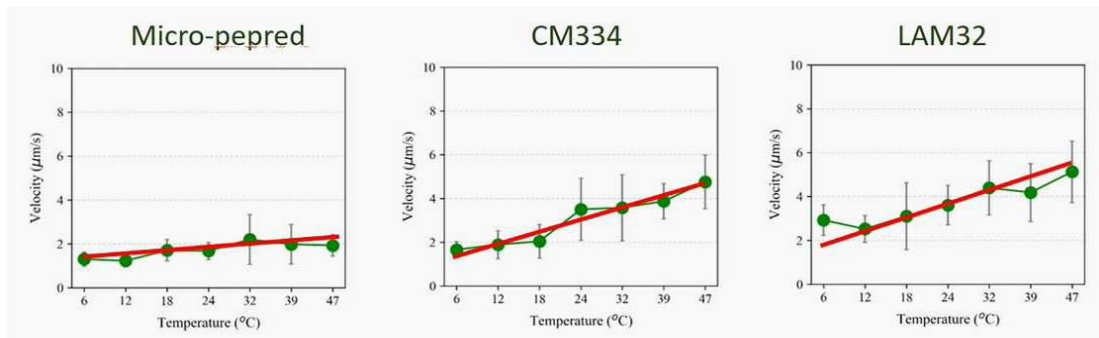
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 식물 세포 내부 유동 관측을 통한 식물 환경 저항성 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 식물 세포 내부의 세포질 유동(cytoplasmic streaming) 관측을 통하여 식물체의 환경 저항성을 평가하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 세포질 유동 분석이라는 하나의 기준으로 식물 환경 스트레스에 따른 세포의 저항성 인과관계를 파악할 수 있으며 이를 통해 효율적인 종자의 우수성 평가가 가능하다. 또한, 실제 작물에서 활용할 때 종과 관계없이 같은 기준을 적용하여 활용할 수 있기에 환경 저항성 우수 작물 선정 및 미래 식량 개발에 활용될 수 있다.

대표도



(71) 출원인

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

연암대학교 산학협력단

충청남도 천안시 서북구 성환읍 연암로 313

(72) 발명자

고영수

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교
국제캠퍼스 공과대학 실험동 223호

남영석

서울특별시 송파구 새말로8길 12, 건영아파트 101
동 904호

박근환

서울특별시 강동구 고덕로 130, 프라이어아파트
106동 603호

이현아

경기도 평택시 지제동삼1로 41, 112동 204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137681
과제번호	2021R1A4A3027074
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구기관
연구사업명	기초연구실 개척형
연구과제명	식물 단일세포 수준 유체역학 기초연구실
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2021.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계들을 포함하는 식물체의 환경 저항성 평가 방법:

- (S1) 대상 식물체 조직으로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 단계;
- (S2) 분리된 원형질체를 포함하는 랩온어칩(lab on a chip)을 제조하는 단계;
- (S3) 환경 스트레스 변수를 점진적으로 변화시키며 상기 원형질체의 세포질 유동 정보를 획득하는 단계;
- (S4) 세포질 유동 정보로부터 환경 스트레스 변수의 변화에 따른 환경 저항성 지수를 도출하는 단계; 및
- (S5) 대상 식물체별 환경 저항성 지수를 비교하여 대상 식물체의 환경 저항성을 평가하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상 식물체 조직은 식물체의 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 종자 및 열매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 랩온어칩(lab on a chip)에는 광 제어 장치, 온도 제어 장치, 양분 제어 장치 및 삼투 제어 장치로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 제어 장치를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포질 유동 정보는 세포질 내 입자의 유동 정보인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포질 내 입자는 세포질에 존재하는 입자 또는 세포 내부로 주입된 입자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 세포질에 존재하는 입자는 미오신, 리소솜, 페록시솜 및 미토콘드리아로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 세포질 내로 주입된 입자는 무독성의 나노 입자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 세포질 내 입자의 유동 정보는 세포질 내 입자의 속도, 방향, 항력 (drag force), 또는 스트림라인 (streamline) 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 환경 저항성 지수는 하기식으로부터 도출되는 것을 특징으로 하는 방법:

$$F = k \times S,$$

식 중, F는 유동 정보, k는 환경 저항성 지수, S는 환경 스트레스 변수를 나타낸다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물 세포 내부의 세포질 유동(cytoplasmic streaming) 관측을 통하여 식물체의 환경 저항성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 세계적인 기후변화에 따라 미래 식량으로 기존 작물들의 환경 저항성이 뛰어난 우수 품종을 만들어내는 것이 중요한 연구로 떠오르고 있다. 식물은 동물에 비해서 다양한 유전자 조작군을 비교할 수는 있다는 장점이 있지만, 여전히 실험 주기가 식물의 생애주기에 맞춰져 있다는 단점이 있다. 거기에 더해 유전자의 다양성으로 인해 특정 유전자가 식물 생장에 미치는 영향은 생장시키기 전까지 확신할 수 없다. 따라서, 유전자를 조작하는 방식은 다분히 시행착오 적이라 할 수 있으며, 원하는 환경 저항성이 나오지 않으면 반복 실험을 진행해야 할 뿐만 아니라, 실패 실험에서 얻을 수 있는 정보가 없다는 문제점이 있다. 또한, 전체 실험 기간은 한 사이클당 식물의 생애주기만큼 늘어나게 된다. 이러한 문제로 인해 평균적으로 하나의 우수 품종을 얻는데 몇 년 이상으로 길어지는 경우도 많다.

[0003] 상기 문제점은 예컨대 랩온어칩(lab on a chip) 기반을 활용한 세포 내부 유동 관측을 통한 환경 저항성 평가 기술로 해결할 수 있다. 랩온어칩 기술은 용어 그대로 마이크로 스케일 칩에 목적에 부합하는 세포나 조직을 배양시켜 실험하는 방식으로 공간 효율과 유지 비용 절감 및 윤리적 문제 해결에 이점을 가지고 있다. 해당 기술의 대표적 연구는 2010년에 폐포 세포와 혈관 세포를 배양하고 탄성 재료인 Polydimethylsiloxane (PDMS) 을 활용하여 폐를 모사한 실험을 예로 들 수 있다. 해당 연구를 통해 랩온어칩 기술의 실효성 및 유효성은 입증되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0004] (비특허문헌 0001) Current Opinion in Plant Biology 2015, 27:104-110
(비특허문헌 0002) Climate Change and Food Security with Emphasis on Wheat 2020, Pages 55-76
(비특허문헌 0003) Journal of AgriSearch, 6(4):153-155

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 랩온어칩 기반의 기술이 단일세포를 다룰 수 있다는 장점을 활용하여, 식물 세포 내부 세포질 유동을 관측하여 식물의 환경 스트레스 저항성을 평가하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 다음의 단계들을 포함하는 식물체의 환경 저항성 평가 방법을 제공한다:

[0007] (S1) 대상 식물체 조직으로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 단계;

[0008] (S2) 분리된 원형질체를 포함하는 랩온어칩(lab on a chip)을 제조하는 단계;

[0009] (S3) 환경 스트레스 변수를 점진적으로 변화시키며 상기 원형질체의 세포질 유동 정보를 취득하는 단계;

[0010] (S4) 세포질 유동 정보로부터 환경 스트레스 변수의 변화에 따른 환경 저항성 지수를 도출하는 단계; 및

[0011] (S5) 대상 식물체별 환경 저항성 지수를 비교하여 대상 식물체의 환경 저항성을 평가하는 단계.

[0012] 상기 대상 식물체 조직은 식물체의 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 종자 및 열매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

- [0013] 상기 랩온어칩(lab on a chip)에는 광 제어 장치, 온도 제어 장치, 양분 제어 장치 및 삼투 제어 장치로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 제어 장치를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0014] 상기 세포질 유동 정보는 세포질 내 입자의 유동 정보인 것이 바람직하다.
- [0015] 상기 세포질 내 입자는 세포질에 존재하는 입자 또는 세포 내부로 주입된 입자인 것이 바람직하다.
- [0016] 상기 세포질에 존재하는 입자는 미오신, 리소솜, 페록시솜 및 미토콘드리아로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0017] 상기 세포질 내로 주입된 입자는 무독성의 나노 입자인 것이 바람직하다.
- [0018] 상기 세포질 내 입자의 유동 정보는 세포질 내 입자의 속도, 방향 또는 스트림라인(streamline)인 것이 바람직하다.
- [0019] 상기 환경 저항성 지수는 하기식으로부터 도출되는 것이 바람직하다:
- [0020] $F = k \times S$,
- [0021] 식 중, F는 유동 정보, k는 환경 저항성 지수, S는 환경 스트레스 변수를 나타낸다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명은 세포질 유동 분석이라는 하나의 기준으로 식물 환경 스트레스에 따른 세포의 저항성 인과관계를 파악할 수 있으며 이를 통해 효율적인 종자의 우수성 평가가 가능하다. 또한, 실제 작물에서 활용할 때 종과 관계없이 같은 기준을 적용하여 활용할 수 있기에 환경 저항성 우수 작물 선정 및 미래 식량 개발에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 마이크로플루이딕칩을 이용한 환경 스트레스 제어 방법을 모식적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 환경 스트레스 변수 중 온도 제어를 적용한 세포질 유동 관측 방법을 모식적으로 나타낸 것이다.
- 도 3은 식물 조직으로부터 원형질체를 분리하는 과정을 모식적으로 나타낸 것이다.
- 도 4는 고추 뿌리 원형질체를 이용한 세포질의 미오신 유동 정도로서 입자 속도를 Track Mate 7 기기를 사용하여 측정하는 것을 보여준다.
- 도 5는 본 발명의 세포질 유동 속도 측정에 사용된 3종의 고추 품종을 나타낸 것이다.
- 도 6은 고추 품종별 온도 스트레스에 따른 세포질 유동 관측 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 고추 품종별 온도 스트레스에 따른 세포질 유동 관측 결과로부터 환경 저항성 지수 k를 구한 것을 나타낸 것이다.
- 도 8은 고추 품종 CM334의 뿌리에서 온도별 세포질 유동 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 감자, 바질 및 고추 작물에서 NaCl 염 스트레스에 따른 유동 관측 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명의 상세하게 설명한다.
- [0025] 식물의 환경 스트레스는 온도 내성, 가뭄 내성, 염, 삼투 내성, 오존 및 빛 내성, 양분 내성 등으로 분류되며, 각 스트레스에 반응하는 유전자는 모두 다르고 식물마다 대응하는 방법이 다르다. 따라서, 기존의 저항성 실험을 위해서는 특정 종, 특정 환경 스트레스에 저항성 연구가 일반적이다. 이런 접근 방식은 유전자별 인과관계를 명확히 밝히기 어렵고, 우수 품종 개발을 위한 실험 기간이 길어지게 된다.
- [0026] 식물의 생장 및 생존에서 세포의 관점으로 보면 유전자 또는 단백질의 물질전달 및 물질대사는 확산(passive)과 세포질 유동(cytoplasmic streaming)을 통해 일어난다. 식물 세포의 크기를 고려했을 때($\sim 100 \mu\text{m}$), 확산만으로 물질대사가 부족하며, 결국 세포질 유동은 식물의 근본적인 생존에 원동력으로 필수 불가결한 요소이다. 실제로, 세포질 유동 속도와 식물 생장 사이의 상관관계는 연구를 통해 검증된 사실이다.
- [0027] 본 발명의 발명자들은 이러한 세포질 유동을 정량적 분석을 통해 각 환경 스트레스에 따른 식물 세포의 저항성

을 평가한다는 점에서 각 환경 스트레스가 세포에 미치는 영향을 판단할 수 있었으며, 실험 기간의 현저한 단축이 가능함을 확인하였다.

- [0028] 따라서, 본 발명은 다음의 단계들을 포함하는 식물체의 환경 저항성 평가 방법을 제공한다:
- [0029] (S1) 대상 식물체 조직으로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 단계;
- [0030] (S2) 분리된 원형질체를 포함하는 랩온어칩(lab on a chip)을 제조하는 단계;
- [0031] (S3) 환경 스트레스 변수를 점진적으로 변화시키며 상기 원형질체의 세포질 유동 정보를 획득하는 단계;
- [0032] (S4) 세포질 유동 정보로부터 환경 스트레스 변수의 변화에 따른 환경 저항성 지수를 도출하는 단계; 및
- [0033] (S5) 대상 식물체별 환경 저항성 지수를 비교하여 대상 식물체의 환경 저항성을 평가하는 단계.
- [0034] 상기 대상 식물체 조직은 식물체의 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 종자 및 열매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0035] 바람직한 일 구체예로서, 대상 식물체 조직으로부터 원형질체를 분리하는 단계는 다음과 같다:
- [0036] (S1-1) 식물의 잎을 8~10장 정도 식물로부터 채취하는 단계;
- [0037] (S1-2) 식물 세포 배양접시에 10ml의 효소액을 준비하는 투입하는 단계;
- [0038] (S1-3) 커팅 매트 위에 식물 잎을 올리고 외과용 칼을 이용하여 최대한 얇게 저미는 단계;
- [0039] (S1-4) 상기 효소액에 얇게 저민 잎을 넣고 락커(rocker) 위에서 60~90분 동안 잘 섞일 수 있도록 낮은 속도로 두는 단계;
- [0040] (S1-5) 14ml 둥근 바닥 튜브에 상기 결과물을 피펫으로 모두 투입하고, 100g의 속도로 3분 동안 원심분리하는 단계;
- [0041] (S1-6) 상층액을 모두 버리고, 2ml의 13% D-sorbitol 용액을 넣어 피펫으로 재현탁하는 단계;
- [0042] (S1-7) 새로운 14ml 둥근 바닥 튜브에 21% sucrose buffer 2ml을 넣고, 상기 결과물을 피펫으로 조심스럽게 옮기며 층이 생기도록 하는 단계;
- [0043] (S1-8) 70g의 속도로 5분 동안 원심분리하여 원형질체를 분리하는 단계;
- [0044] (S1-9) 1ml 피펫을 이용하여 녹색층을 조심스럽게 취하여 새로운 14ml 둥근 바닥 튜브에 옮기는 단계;
- [0045] (S1-10) Pre-chilled W5 solution을 상기 결과물에 넣어 10ml로 조절하는 단계;
- [0046] (S1-11) 100g의 속도로 3분 동안 원심분리하는 단계;
- [0047] (S1-12) 상층액을 모두 버리고, 10ml의 W5 solution을 넣어 재현탁하는 단계;
- [0048] (S1-13) 100g의 속도로 원심분리하는 단계;
- [0049] (S1-14) 상층액을 모두 버리고 MMG solution을 넣어 재현탁하는 단계; 및
- [0050] (S1-15) Hemocytometer를 사용하여 광학 현미경에서 원형질체의 농도를 측정하는 단계.
- [0051] 상기 랩온어칩(lab on a chip)에는 광 제어 장치, 온도 제어 장치, 양분 제어 장치 및 삼투 제어 장치로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 제어 장치를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0052] 바람직한 일 구체예로서, 식물 생장에 영향을 줄 수 있는 환경 스트레스 변수 중 하나, 혹은 복합적으로 확인하고자 하는 환경 스트레스 변수 하나 이상을 정한다. 이후 관측은 환경 스트레스를 점진적으로 변화시키며 진행된다. 환경 스트레스 제어 방법은 도 1 및 도 2에 설명되어 있다. 광 제어는 solar simulator를 통해 제어하며, 온도 제어는 칩 외곽으로 흐르는 물의 온도를 항온 수조 온도로 제어한다. 양분 및 삼투 제어는 세포 직접적으로 제공되는 배양액의 농도와 양분을 바꾸어주거나, 양쪽에 O₂, CO₂ 채널을 활용하여 배양액 내에 산소 농도를 조절한다.
- [0053] 상기 세포질 유동 정보는 세포질 내 입자의 유동 정보인 것이 바람직하다.
- [0054] 상기 세포질 내 입자는 세포질에 존재하는 입자 또는 세포 내부로 주입된 입자인 것이 바람직하다.

[0055] 상기 세포질에 존재하는 입자는 미오신, 리소솜, 페록시솜 및 미토콘드리아로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0056] 상기 세포질 내로 주입된 입자는 무독성의 나노 입자인 것이 바람직하다.

[0057] 상기 세포질 내 입자의 유동 정보는 세포질 내 입자의 속도, 방향, 항력 (drag force), 또는 스트림라인 (streamline) 인 것이 바람직하다.

[0058] 바람직한 일 구체예로서, 상기 세포질 유동은 액틴 필라멘트 위에서 ATP를 소모하며 걸어가는 미오신(myosin)에 의해 발생하게 된다. 따라서, 우선 Green Fluorescent Protein(GFP) 염색을 통해 미오신의 유동 정보 (속력, 방향, streamline) 를 형광 현미경을 활용하여 측정한다. 광학 현미경을 활용하여 세포질에서 미오신이 만들어 내는 유동으로 움직이는 약 1 μ m 내외의 입자(리소솜, 페록시솜, 미토콘드리아 등)들을 추적하여 유동 정보를 측정한다. 세포 조건에 따라 내부 추적 가능한 입자가 적은 경우, 독성이 없는 나노 입자를 세포 내부로 주입하여 추적한다.

[0059] 바람직한 일 구체예로서, 미오신의 유동 속도와 세포 내 입자의 유동 속도의 차이에서 구할 수 있는 유효 점성과 실제 세포 내 점성을 비교하여 스트레스 환경에서 세포질의 유체 특성을 정량화한다. 유효 점성은 아래 식을 따르며, 실제 세포 내 점성은 세포질 내에 브라운 운동(진동)하는 입자의 이동 거리를 측정하여 구한다.

$$\sqrt{d^2} = \sqrt{k_b T} \sqrt{\frac{t}{3\pi\mu r}}$$

[0060] (d : 입자의 이동거리, k_b : 볼츠만 상수, T : 온도, t : 시간, μ : 점성, r : 입자 반지름)

[0061] 상기 환경 저항성 지수는 하기식으로부터 도출되는 것이 바람직하다:

$$F = k \times S$$

[0063] 식 중, F는 유동 정보, k는 환경 저항성 지수, S는 환경 스트레스 변수를 나타낸다.

[0064] 바람직한 일 구체예로서, 환경 스트레스 변수에 따른 유동 변화를 상기 관계식으로 나타내고 만족하는 상수를 환경 저항성 지수 k로 정의한다. 종자별 저항성 지수를 비교하여 우수 품종을 판단하고 생장을 통해 검증 혹은 우수 품종으로 활용한다.

[0065] 이하에서는, 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 일 구체예를 기재한 것이며, 하기 실시예에 기재된 사항에 의하여 본 발명의 권리범위가 한정되어 해석되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 고추 품종별 온도 스트레스 저항성 평가

[0069] 도 5에 나타난 고추 품종별(Micro pepred, CM334 및 LAM32) 온도 스트레스 저항성을 평가하였다. 고추 뿌리 세포로부터 분리된 원형질체가 장착된 마이크로플루이드칩을 이용하여 환경 스트레스로서 온도를 변수로 하여 6~47℃로 변화시키면서 미오신 유동 정보를 TrackMate7 이미지 분석 프로그램을 사용하여 측정하였다.

[0070] 도 6에서는 고추 품종별로 온도에 따른 세포질 유동 속도의 변화를 보여주고 있다. 또한, 도 7에서는 고추 품종별 온도 변화에 따른 세포질 유동 속도의 변화로부터 환경 저항성 지수 k를 판단하였다. $F = k \times S$ 의 식에서 F는 유동 정보, k는 환경 저항성 지수, S는 환경 스트레스 변수를 나타낸다. 도 7에서는 환경 스트레스 변수 S가 온도, 유동 정보 F가 세포질 유동 속도이므로 온도에 따른 유동 속도 기울기를 환경 저항성 지수 k로 판단할 수 있다. 온도 스트레스에 대한 항상성이 높을수록 유동 속도 변화가 적다. 즉, k가 작은 Micro-pepred 품종이 다른 두 품종에 비하여 온도 저항성이 높은 것으로 확인되었다.

실시예 2. 고추 품종 CM334에서 온도별 세포질 유동 측정

[0073] 실시예 1과 동일한 방법으로 고추 품종 CM334의 뿌리 원형질체를 분리하여 마이크로플루이드칩을 이용하여 환경 스트레스로서 온도를 변수로 하여 6~47℃로 변화시키면서 미오신 유동 정보를 TrackMate7 이미지 분석 프로그램을 사용하여 측정하였다(도 8).

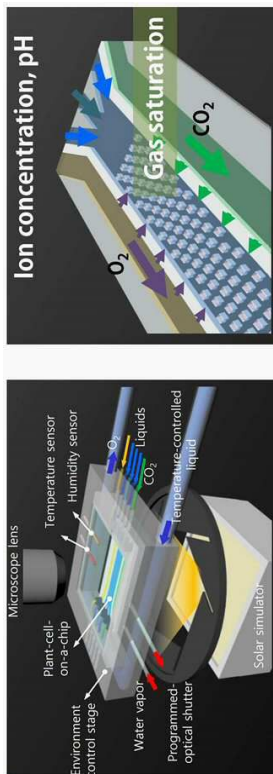
[0075] 실시예 3. 작물별 염 스트레스에 따른 세포질 유동 측정

[0076] 감자, 바질 및 고추 작물에서 NaCl의 농도별 염 스트레스 저항성을 평가하기 위하여 NaCl의 농도를 1~500mM로 변화시키면서 세포질 유동 속도를 측정하였다.

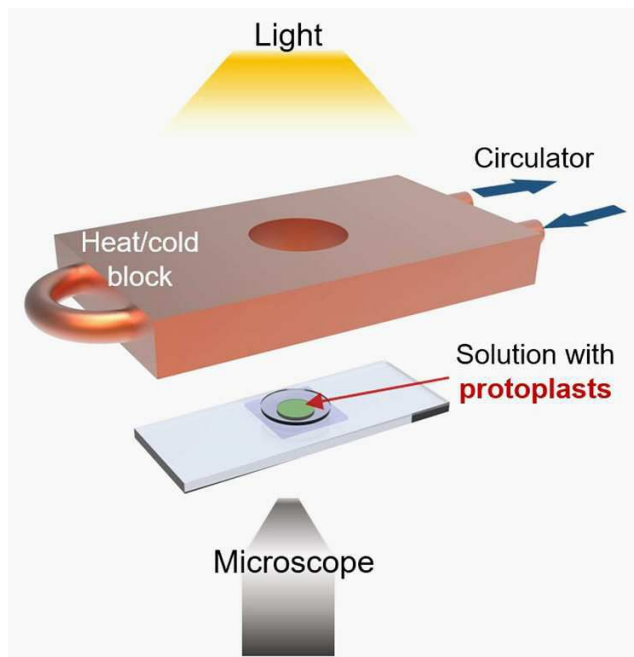
[0077] 도 9에 나타난 바와 같이, 감자에서 염 스트레스 저항성이 가장 우수하였으며, 고추에서 염 스트레스 저항성이 가장 취약함을 알 수 있었다.

도면

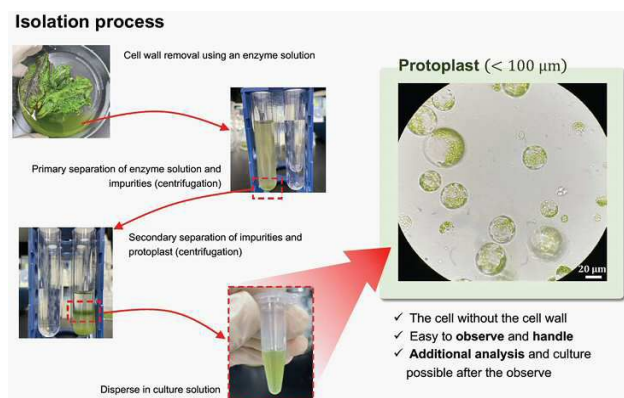
도면1



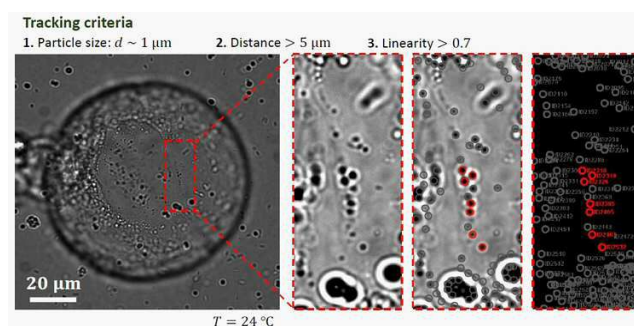
도면2



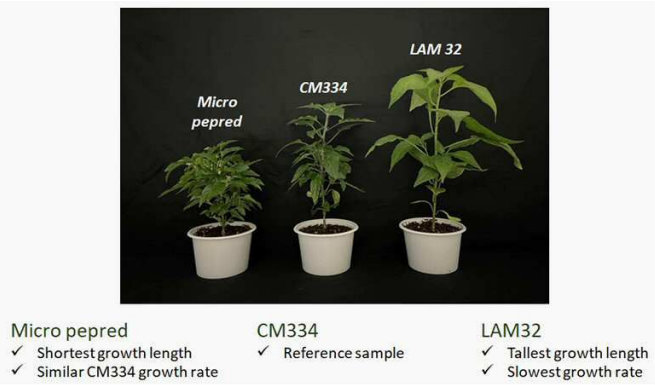
도면3



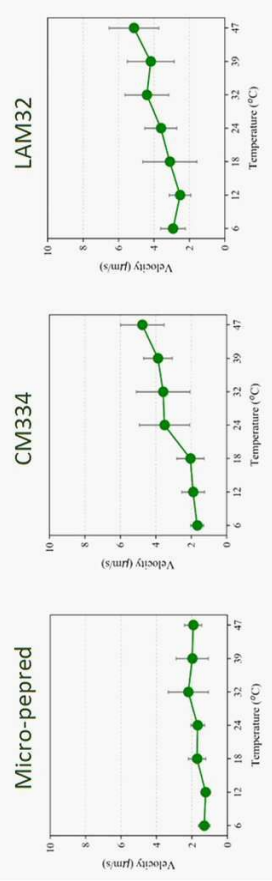
도면4



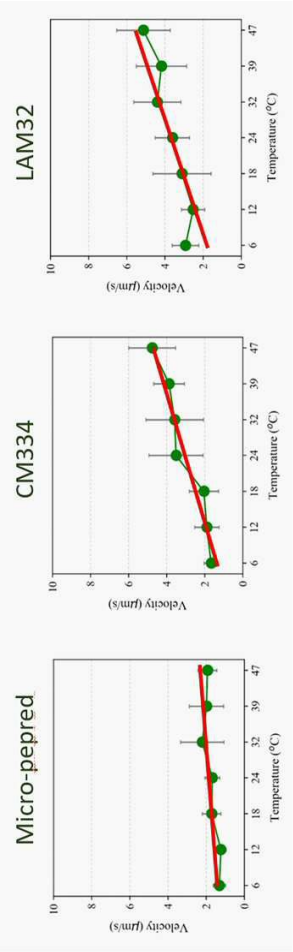
도면5



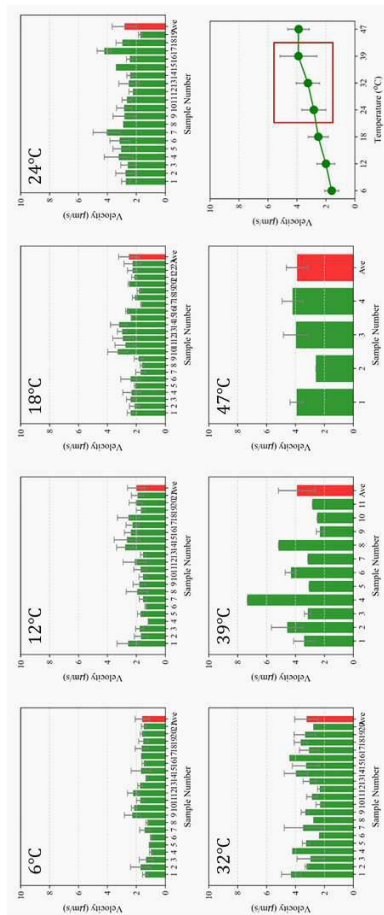
도면6



도면7



도면8



도면9

