

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2014-0046649 2014년04월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	<i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/115</i> (2010.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01)	(71) 출원인	경희대학교 산학협력단
(21) 출원번호	10-2012-0111999		경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(22) 출원일자	2012년10월09일	(72) 발명자	하상수
심사청구일자	2012년10월09일		경기도 남양주시 도농동 부영그린타운아파트2단지 210동 1201호
			김지수
			인천 부평구 화랑로105번길 22, 101동 1104호 (산곡동, 선포아파트)
			이관호
			경북 안동시 함전길 12, 101동 1305호 (송현동, 송현동우성아파트)
		(74) 대리인	손민

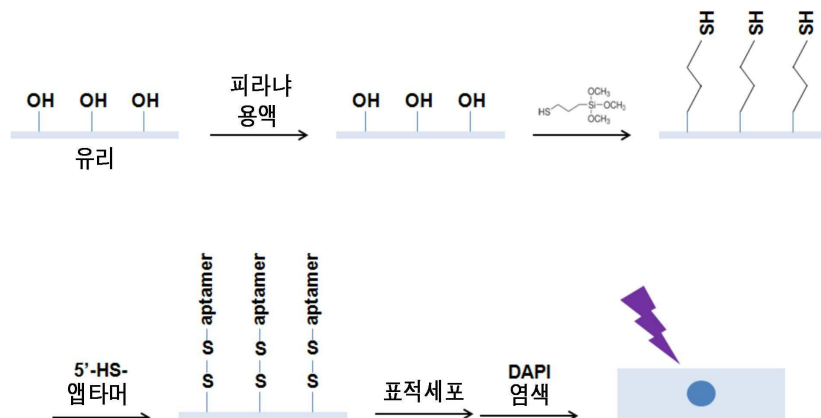
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **애타머 칩을 이용한 표적 세포의 검출 및 정량 방법**

(57) 요약

본 발명은 애타머 칩을 이용하여 표적 세포를 검출하는 방법 및 정량하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포 염색 용액(예컨대, DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole)과 상기 표적 세포가 결합된 애타머 칩을 반응시켜 표적 세포를 검출 및/또는 정량하는 방법, 이황화결합으로 결합된 애타머 칩 및 이의 재사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0021956
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	엠타머를 이용한 관심 금속이온의 선택적 추출
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2012-001680
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	나노물질을 이용한 고감도의 DNA 메틸화 정량분석방법 개발
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

애타머(aptamer) 칩을 이용한 표적 세포의 검출 방법에 있어서,

- (a) 표적 세포를 포함하는 시료를 애타머 칩과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 표적 세포가 결합된 애타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시키는 단계를 포함하는, 애타머 칩을 이용한 표적 세포의 검출 방법.

청구항 2

애타머(aptamer) 칩을 이용한 표적 세포의 정량 방법에 있어서,

- (a) 표적 세포를 포함하는 시료를 애타머 칩과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 표적 세포가 결합된 애타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시키는 단계; 및
- (c) 세포 염색 용액과 반응한 부분의 세기를 측정하는 단계를 포함하는, 애타머 칩을 이용한 표적 세포의 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 표적 세포의 검출은 육안으로 판별하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 세포 염색 용액은 세포핵을 염색하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin) 또는 Hoechst; 세포질을 염색하는 에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet) 또는 오렌지 G(orange G); 및 미토콘드리아를 염색하는 로다민 123(rhodamine 123), 미토트랙커(MitoTracker), 야누스그린 B(janus green B), 테트라졸리움염(tetrazolium salt), DASPMI(Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodine), DASPEI(2-(4-(dimethylamino)styryl)-N-Ethylpyridinium Iodide), DiOC6(3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide), DiOC7(3,3'-Diheptyloxacarbocyanine Iodide) 또는 JC-1(5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine chloride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 애타머 칩은 기판 상에 애타머가 고정된 것인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 앵타머는 5' 말단에 티올기(thiol group; -SH)가 결합된 RNA 앵타머인 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 앵타머는 HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 또는 PSMA(prostate-specific membrane antigen)와 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 (a) 단계의 표적 세포는 HER2 또는 PSMA를 발현하는 세포인 것인 방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 기판은 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄 및 실리콘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 기판은 실란 처리를 통해 표면 상에 반응기로서 티올기를 갖는 것인 방법.

청구항 11

- (a) 이황화결합으로 앵타머를 고정화시킨 칩과 표적 세포를 포함하는 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 표적 세포가 결합된 앵타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시켜 표적 세포를 검출 또는 정량하는 단계;
- (c) 상기 앵타머 칩에 이황화결합 환원 용액을 처리하여 앵타머를 분리하는 단계; 및
- (d) 앵타머가 분리된 칩에 앵타머 분자를 재고정시키는 단계를 포함하는, 앵타머 칩의 재사용 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (c) 단계 이전에 세포 용해 세제(cell lysis detergent)를 처리하여 앵타머 칩에 결합된 표적 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 앵타머는 5' 말단에 티올기가 결합된 RNA 앵타머인 것인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 앵타머 칩의 기판은 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄 및 실리콘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기판으로, 실란 처리를 통해 표면 상에 반응기로서 티올기를 갖는 것인 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제공되는 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머가 기판에 이항화결합에 의해 결합된 앵타머 칩.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 앵타머 칩을 이용하여 표적 세포를 검출하는 방법 또는 정량하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포 염색 용액(예컨대, DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole)과 상기 표적 세포가 결합된 앵타머 칩을 반응시켜 표적 세포를 검출 및/또는 정량하는 방법, 이항화결합으로 결합된 앵타머 칩 및 이의 재사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 앵타머(aptamer)는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 무작위적인 서열을 가지는 핵산 라이브러리인 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 과정을 통해 얻을 수 있다.

[0003] 이와 같은 앵타머는 항체의 좋은 대안으로 여겨지고 있는데, 많은 앵타머들은 금속이온들과 작은 화학 분자들, 단백질들, 심지어 세포에 대해서 나노몰에서 피코몰 수준의 해리상수를 가질 만큼 특이적으로 결합한다고 알려져 있다. 또한, 앵타머는 항체와 비교하여 구체적인 실험에서 보다 유리한 다음과 같은 특징들이 있다. 첫 번째 특징은 앵타머가 어떤 분자들(작은 무기이온들로부터 세포까지)을 표적으로 정할 수 있게 구축된 핵산 라이브러리로부터 얻을 수 있다는 점이다. 이와 같은 특징은 세포나 동물로부터 얻어져야 하는 항체의 제한점을 극복할 수 있게 한다. 두 번째 특징은 높은 순도를 가지는 앵타머를 다량 얻기 위하여 상기 라이브러리로부터 선정된 앵타머를 PCR(polymerase chain reaction) 과정을 통해 증폭시키거나 전사과정을 진행할 수 있다는 점을 들 수 있다. 세 번째 특징은 앵타머가 비교적 단순한 화학적 구조를 가졌기 때문에 고체표면에 고정화하는 등의 다른 목적으로 사용하고자 하는 경우 그 작용기를 수식하기 쉽다는 점이다. 마지막으로, 앵타머는 항체보다 훨씬 더 안정하기 때문에 좀 더 열악한 조건(높은 온도나 극단의 pH)을 필요로 하는 화학적 응용 과정에 이용될 수 있다. 그 밖에도 앵타머는 화학적으로 대량 합성이 가능하므로 경제성이 우수하고, 항체에 버금가는 표적 친화력을 가지는 한편, 그 크기는 항체에 비해 월등히 작다(약 1 내지 2 nm)는 특징을 가지고 있다.

[0004] 이와 같은 항체에 비해 우수한 앵타머의 효과로 인해 앵타머를 이용한 특정 분자에 대한 바이오센서를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 앵타머 어레이(aptamer arrays)를 제작하는 것은 매우 유용하다. 최근 유전자와 질병을 분석하기 위한 강력한 도구로 각광받고 있는 고집적 DNA 기반 마이크로 어레이(highly integrated DNA-based micro arrays)는 DNA와 같은 핵산을 검출하는데 사용되었지만, 그 검출 결과만으로는 우리가 필요로 하는 모든 정보를 얻을 수 없기 때문에, 좀 더 풍부한 정보를 얻기 위한 단백질 또는 세포를 직접 검출 및 정량하기 위한 핵산 형태의 앵타머 기반 마이크로 어레이에 대한 요구가 커지고 있다. 특정 세포에서 발현되는 단백질에 대한 정보를 얻기 위해 이와 특이적으로 결합하는 단백질(항원 또는 항체)이 고체표면에 고정화된 단백질 기반 마이크로 어레이를 이용하기도 하지만 이는 항체를 고체표면에 고정한 후 이용한다는 점에서 경제성이 낮고, 단백질의 변성 없이 마이크로 어레이를 유지하기 쉽지 않다는 문제점이 있다. 이러한 측면에서 앵타머 기반 마이크로 어레이는 세포나 발현된 단백질을 인식하기 위한 DNA 기반 마이크로 어레이의 성능을

잠재적으로 확장시킬 수 있다. 애플타머는 핵산이기 때문에, 쉽게 표적 물질을 검출하고 정량하기 위한 애플타머 기반 마이크로 어레이의 발굴을 위해서 DNA 어레이를 통해 습득한 경험들을 적용하여 매우 작은 사이즈의 애플타머 기반 마이크로 어레이를 개발하고자 하는 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 전형적인 바이오센서는 일반적으로 두 가지 구성요소로 이루어져 있다. 구체적으로, 표적을 인식할 수 있는 구성요소(효소, 항체, 수용체 등) 및 변환기(transducer) 구성요소로 이루어져 있다. 하나의 물질을 분석하기 위해 여러 과정이 필요한 분광광도기 또는 질량분석기와 같은 다른 분석방법과는 다르게, 바이오센서는 비교적 간단한 과정에 의해 수행되는 분석방법이다. 바이오센서 분야에서 애플타머를 응용하는 경우, 애플타머가 표적 물질을 높은 특이성 및 결합력으로 인식할 뿐만 아니라, 애플타머의 특성을 쉽게 조절할 수 있다는 장점을 가진다. 하지만 바이오센서의 감도는 변환기에 의해 큰 영향을 받는 특징이 있기 때문에, 특정 분자의 검출 및 정량을 위한 애플타머 기반 바이오센서에 응용하기 위해서 사용될 수 있는 변환기들이 또한 많이 개발되어 왔다. 그러나 현재까지 개발된 애플타머와 바이오 물질의 결합에 의해 생성된 신호를 변환하기 위한 기술들은 전기화학적 신호 검출(한국공개특허 제10-2011-0126942호 참조) 또는 형광 검출(한국등록특허 제10-0896987호 참조)을 위한 형태로서, 마이크로물 내지 나노물 수준의 검출 한계를 가지며, 또한 상기 기술들이 적용되기 위해서는 검출 및 정량을 위해 값비싼 장비들이나 화학물질이 필요하다는 문제점이 있어 왔다. 그리고 전기화학적 신호를 이용하거나 형광을 이용한 검출 및 정량을 위해서는 산화나 환원이 가능한 화학물질 또는 형광단을 원하는 표적 분자에 표지하는 과정을 필요로 하므로, 분석 단계가 복잡해지는 문제점이 있었다.

[0006] 이에 본 발명자들은 기존의 바이오센서가 가지고 있는 고가의 별도의 장비가 필요한 문제점 및 비효율성을 극복하기 위해 예의 노력한 결과, 애플타머 기반 바이오 칩을 세포 검출에 일반적으로 사용되는 염색법을 이용하여 분석하면 상기 애플타머 칩에 특이적으로 결합된 표적 세포의 수에 따라 신호의 세기가 증가하는 것을 UV를 조사하는 간단한 방법으로 육안으로 확인할 수 있으며, 일반적인 분석기를 이용해 표적 세포의 정량적인 분석이 가능하고, 이황화결합을 환원시켜서 칩을 재사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 표적 세포를 포함하는 시료를 애플타머 칩과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 표적 세포가 결합된 애플타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시키는 단계를 포함하는, 애플타머 칩을 이용한 표적 세포의 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 (a) 표적 세포를 포함하는 시료를 애플타머 칩과 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 세포가 결합된 애플타머 칩과 세포핵, 세포질 또는 미토콘드리아 염색 용액을 반응시키는 단계; 및 (c) 세포 염색 용액과 반응한 부분의 세기를 측정하는 단계를 포함하는, 애플타머 칩을 이용한 표적 세포의 정량 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 (a) 이황화결합으로 애플타머를 고정화시킨 칩과 표적 세포를 포함하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 세포가 결합된 애플타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시켜 표적 세포를 검출 또는 정량하는 단계; (c) 상기 애플타머 칩에 이황화결합 환원 용액을 처리하여 애플타머를 분리하는 단계; 및 (d) 애플타머가 분리된 칩에 애플타머 분자를 재고정시키는 단계를 포함하는, 애플타머 칩의 재사용 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 재사용 방법에 사용되는 재사용 가능한 애플타머 칩을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 표적 세포를 포함하는 시료를 애플타머 칩과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 표적 세포가 결합된 애플타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시키는 단계를 포함하는, 애플타머 칩을 이용한 표적 세포의 검출 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 용어 "애플타머 칩"이란 "애플타머 어레이", "애플타머 기반 칩" 등과 혼용될 수 있으며, 표면 개질된 유리, 실리콘, 폴리프로필렌 등의 고분자 기판을 포함하는 여러 가지 종류의 고체 표면에 애플타머를 정해진 위치에

고밀도로 부착시켜 미세 집적시킨 것을 통칭하여 의미하는 것으로, 기관 상에 앵타머가 고정된 것일 수 있다.

[0013] 상기 기관의 종류는 당업계에 통상적으로 사용되는 앵타머 칩 제작을 위한 고체 기관이면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄, 화합물 반도체 및 실리콘 등이 있을 수 있으며, 보다 바람직하게는 유리판을 이용할 수 있다. 상기 기관은 표면 처리되는 데, 표면 처리는 앵타머 분자의 부착 및 고정화를 용이하게 하기 위하여 수행된다. 또한 표면 처리는 앵타머 칩의 기질 표면에 앵타머를 고정화시키기 위한 반응기를 포함할 수 있도록 수행될 수 있다. 유리 기관이나 반도체 기관의 경우 실란 처리를 하여 아미노기(amino group; $-NH_2$, $-NH_3^+$ 등) 또는 티올기(thiol group; $-SH$)를 형성할 수 있다. 또한 실란 처리를 효과적으로 하기 위하여 실란 처리에 앞서 히드록실기(hydroxyl group; $-OH$)를 도입하기 위한 처리를 수행할 수도 있다. 보다 바람직하게는 티올기를 반응기로 가질 수 있다. 이와 같이 티올기를 반응기로 가질 수 있도록 상기 기관을 실란 처리할 수 있다.

[0014] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 유리 슬라이드를 피라냐 용액으로 처리하여 표면에 반응성이 높은 히드록실기가 노출되도록 하고, MPTMS((3-mercaptopropyl)trimethoxysilane)를 처리하여, 티올기를 유리 슬라이드 표면에 반응기로 형성하도록 하였다(실시예 3).

[0015] 본 발명에서 용어 "앵타머"란, 시료 내의 검출하고자 하는 표적 세포의 표면에 발현되는 단백질과 특이적으로 결합하여 표적 세포를 포획할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 세포의 존재를 확인할 수 있다. 앵타머의 제조는 일반적인 앵타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 세포의 표면에 특징적으로 발현하는 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 앵타머 칩의 반응기에 결합할 수 있도록, 티올기, 카르복실기, 히드록실기 또는 아민기로 변형시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0016] 본 발명의 목적상 상기 앵타머는 바람직하게는 5' 말단에 티올기가 결합된 RNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 표적 세포와 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머는 시험관 내(*in vitro*) 선택 방법인 셀렉스(SELEX)를 이용하여 표적 세포의 표면에 특징적으로 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 선택하여 표적 세포의 검출 및/또는 정량을 위한 앵타머로 이용할 수 있다. 셀렉스 방법은 다양한 형태의 선택된 기능을 수행하는 단일가닥 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드를 찾기 위한 시험관 내 선택 방법으로서, 셀렉스 방법에 의해 약 10^{15} 개에 달하는 임의의(random) 집단의 서로 다른 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로부터 원하는 기능을 가진 앵타머를 찾을 수 있다. 이때 각 올리고뉴클레오타이드는 고유한 삼차원 구조를 가지며, 원하는 기능(예를 들어, 특정 단백질에 대한 선택적 인식)을 가지는 올리고뉴클레오타이드에 대한 반복적인 선택, 그리고 전통적인 분자생물학적인 방법에 의해 선택된 올리고뉴클레오타이드의 서열을 증폭하게 된다. 이러한 반복적인 선택과 증폭 과정을 거치면서, 궁극적으로 원하는 분자나 그 화학 과정에 대한 전이 상태(transition states)에 대해 선택적인 결합성을 가지는 올리고뉴클레오타이드가 그 집단의 대부분을 차지하게 된다. 그리고 이러한 과정의 마지막에 얻어진 각 앵타머의 서열을 확인하게 된다. 이러한 셀렉스를 자동화한 키트 또한 상용화된 것을 사용할 수 있다(예를 들어, 바이오맥 2000 피펫팅 로봇; Biom다 2000 pipetting robot, Beckman Coulter, USA).

[0018] 상기 앵타머는 표적 세포의 특징에 따라 자유롭게 선택될 수 있으며, 표적 세포에서 과발현되는 단백질과 특이적으로 결합할 수 있는 RNA 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 상기 단백질은 세포막에서 발현되는 세포막 단백질들로 표적 세포에서 특징적으로 발현되는 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머이면 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게는 HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 또는 PSMA(prostate-specific membrane antigen) 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머일 수 있다. 상기 HER2 또는 PSMA의 서열은 공지된 데이터베이스 등에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI GenBank 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 세포막 단백질과 RNA 앵타머 사이의 결합력(K_d = 수 pM 즉, 10^{-12} M 수준)은 해당 단백질과 항체 간의 결합력(K_d = 약 10^{-5} 내지 10^{-12} M)보다 더 높거나 이에 상응하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이러한 결합을 세포막 단백질과 이에 특이적으로 결합하는 앵타머의 결합력을 이용하는 앵타머 칩은 간단하면서도 선택성과 감도가 뛰어난 검출능을 제공할 수 있다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 세포막 단백질로서 유방암 세포에서 과발현되는 것으로 알려진 HER2 단백질을

또는 전립선암 세포에서 과발현되는 것으로 알려진 PSMA 단백질에 특이적으로 결합하는 RNA 앵타머를 이용하여 제작한 앵타머 칩과 반응시켜서 해당 단백질을 발현하는 세포를 특이적으로 포획할 수 있는지 여부를 확인하였다.

- [0020] 상기 (a) 단계의 표적 세포를 포함하는 시료를 앵타머 칩과 접촉시키는 단계는 앵타머와 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 발현하는 표적 세포를 포획시켜 검출하기 위하여 접촉시키는 단계이다.
- [0021] 본 발명에서 용어 "표적 세포"란, 앵타머 칩을 사용하여 시료 내에 존재하고 있는지 여부를 검출하고자 하는 세포로서, 구체적으로 상기 앵타머에 특이적으로 결합하는 세포막 단백질을 발현하여 이들 간의 결합에 의해 앵타머 칩에 포획되어 검출될 수 있는 세포로서, 상기 세포막 단백질의 종류는 당업계에서 통상적으로 알려진 단백질은 제한없이 사용 가능하다. 보다 구체적으로, 상기 세포막 단백질은 이에 제한되지 않으나, 질환 발병시 발현 수준이 증가 또는 감소하는 단백질인 경우, 본 발명의 앵타머 칩을 이용하여 해당 질환의 발병 여부를 진단할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 표적세포로서 HER2를 발현하는 유방암 세포주 또는 PSMA를 발현하는 전립선암 세포주를 사용하였다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "시료"란 검출하고자 하는 표적 세포를 포함할 가능성이 있는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 타액, 객담 또는 뇌척수액 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 표적 세포를 포함하는 시료를 앵타머가 고정된 기관과 접촉시키면 시료 내의 표적 세포와 앵타머 간의 특이적인 결합반응이 일어난다. 예컨대, 표적 세포에서 과발현되는 세포막 단백질과 앵타머 간의 직접적인 결합을 통해 복합체를 형성함으로써 표적세포를 앵타머 칩 상에 포획할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 기관 위에 고정된 HER2 또는 PSMA 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머와 HER2 단백질을 과발현하는 유방암 세포주, PSMA 단백질을 과발현하는 전립선암 세포주를 포함하는 시료를 접촉시켜서 특이적인 결합반응을 수행하였다(실시예 4).
- [0025] 상기 (b) 단계의 표적 세포가 결합된 앵타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시키는 단계는 앵타머에 특이적으로 결합한 표적 세포를 육안으로 확인하기 위한 단계이다.
- [0026] 본 발명의 세포 염색 용액은 일반적으로 세포 염색에 사용되는 세포핵, 세포질 또는 미토콘드리아 염색에 사용되는 물질일 수 있다. 바람직하게 세포핵을 염색하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin) 또는 Hoechst 등, 세포질을 염색하는 에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet) 또는 오렌지 G(orange G) 등, 또는 미토콘드리아를 염색하는 로다민 123(rhodamine 123), 미토타랙커(MitoTracker), 야누스그린 B(janus green B), 테트라졸리움염(tetrazolium salt), DASPMI(Dimethylaminostyrylmethylpyridinium iodide), DASPEI(2-(4-(dimethylamino)styryl)-N-Ethylpyridinium Iodide), DiOC6(3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide), DiOC7(3,3'-Diheptyloxacarbocyanine Iodide) 또는 JC-1(5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine chloride) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 세포핵을 염색하는 DAPI일 수 있다. 상기 세포 염색 용액을 이용한 검출 방법은 염색 방법이 간단하고 소요되는 시간이 짧고 간단한 광원을 조사하여 육안으로 확인이 가능하며, 기존의 앵타머 칩의 검출 방법으로 사용되는 (i) 앵타머와 표적 분자간의 결합 전후에 나타나는 전자 전달정도를 감응하여 반응하는 전기화학적 방식 (ii) 형광물질을 표지하여 형광측정을 통한 광학적 방식 및 (iii) 표적 물질과의 결합 전후에 나타나는 질량의 차이를 분석하여 측정하는 질량 분석 방식과 비교하여 복잡한 과정을 단순화할 수 있으며, 값비싼 검출 기기 등을 필요로 하지 않으므로 고비용의 단점 또한 극복할 수 있다. 특히, 기존의 형광 검출 방법을 이용한 앵타머 검출 방법은 앵타머 자체 또는 앵타머에 결합하는 상보적인 DNA에 형광물질을 연결하는 단계의 번거로움이 있는 단점이 있어왔지만, 본 발명의 염색 용액은 시료와 혼합하여 수 분간 반응시키는 간편한 방법으로 염색할 수 있다는 장점이 있다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 표적 세포를 결합시킨 칩을 세포핵 염색 용액인 DAPI 용액과 함께 37℃에서 15분간 인큐베이션한 후, UV를 조사하여 표적 세포가 RNA 앵타머에 특이적으로 결합한 것을 육안으로 확인하였다. 아울러 표적 세포를 10^3 개의 세포 보다 바람직하게는 10^4 개의 세포까지 검출할 수 있는 것으로 확인하여 (도 2C), 검출 감도가 높은 것을 확인하였다. 또한 표적 세포가 다른 세포와 혼합된 시료에 대해서도 시료 중 표적 세포의 비율에 비례하여 검출 가능함을 확인(도 2C)함으로 본 발명에 따른 앵타머 칩은 높은 민감도와 특이도로 표적 세포를 검출할 수 있음을 확인하였다.

- [0028] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 표적 세포를 포함하는 시료를 앵타머 칩과 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 세포가 결합된 앵타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시키는 단계; 및 (c) 세포 염색 용액과 반응한 부분의 세기를 측정하는 단계를 포함하는, 앵타머 칩을 이용한 표적 세포의 정량 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 (a) 및 (b) 단계는 앞에서 설명한 방법과 동일하다.
- [0030] 상기 (c) 단계의 세포 염색 용액과 반응한 부분의 세기를 측정하는 단계는 시료 내에 존재하는 표적 세포를 정량 분석하기 위한 단계이다.
- [0031] 시료 내에 존재하는 표적 세포의 농도가 증가할수록 세포 염색 용액과 반응에 의한 신호세기가 증가하므로 표적 세포를 정량할 수 있으며, 일반적인 광학 스캐너, 덴시토메트리(densitometry), 이미지 분석 장치, 아도브(Adobe)사의 포토샵 소프트웨어 등을 사용하여 정량할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 표적 세포의 농도가 증가할수록 세포핵을 염색하는 DAPI에 의한 형광세기가 증가하는 것을 확인하였으며, 10^3 개 내지 10^6 개의 세포에 이르는 넓은 범위 내의 세포를 정량할 수 있음을 확인하였다(도 2C).
- [0033] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 이황화결합으로 앵타머를 고정화시킨 칩과 표적 세포를 포함하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 세포가 결합된 앵타머 칩과 세포 염색 용액을 반응시켜 표적 세포를 검출 또는 정량하는 단계; (c) 상기 앵타머 칩에 이황화결합 환원 용액을 처리하여 앵타머를 분리하는 단계; 및 (d) 앵타머가 분리된 칩에 앵타머 분자를 재고정시키는 단계를 포함하는, 앵타머 칩의 재사용 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 앵타머 칩의 재사용이란 하나의 앵타머 칩을 1회 이상 사용하는 것을 의미하며, 재사용 횟수는 제한되지 않으며, 검출 세기에 영향을 주지 않는 한 지속적으로 다시 사용할 수 있다.
- [0035] 상기 (a) 내지 (b) 단계는 앞서 설명한 단계에서 사용된 방법 등과 유사하다.
- [0036] 본 발명의 재사용에 사용되는 앵타머 칩은 바람직하게는 5' 말단에 티올기(thiol group; -SH)가 결합된 RNA 앵타머일 수 있다.
- [0037] 상기 앵타머 칩의 기판은 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄 및 실리콘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 기판일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0038] 상기 앵타머 칩의 기판은 바람직하게는 표면 상에 티올기를 반응기로 갖는 것일 수 있다. 이와 같이 티올기를 반응기로 가지도록 하기 위하여 상기 기판을 실란 처리할 수 있다. 이에 따라 제조된 상기 기판은 티올기를 통해 5' 말단에 티올기가 결합된 RNA 앵타머와 이황화결합에 의해 결합할 수 있다. 이와 같은 이황화결합은 기존의 가교결합제 등을 이용한 공유결합 방식으로 결합시킨 앵타머 칩과 달리, 이황화결합의 환원을 통해 칩의 재사용이 가능하다.
- [0039] 상기 (c) 단계의 이황화결합을 환원시킬 제제는 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대, DTT(dithiothreitol), β -머캅토에탄올(β -mercaptoethanol), β -머캅토에틸아민(β -mercaptoethylamine) 또는 TCEP(tris[2-carboxyethyl] phosphine) 등일 수 있다. 바람직하게 DTT일 수 있다.
- [0040] 바람직하게, 상기 (c) 단계 이전에 세포 용해 세제(cell lysis detergent)를 처리하여 앵타머 칩에 결합된 표적 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 표적 세포의 분리는 상기 세포 용해 세제에 의한 세포의 용해에 의해 수행될 수 있다. 상기 세포 용해 세제는 세포를 용해시켜 앵타머 칩으로부터 제거할 수 있는 물질이면 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게 트리톤 X-100(triton X-100), 트윈 20(tween 20), 스팬 20(span 20), SDS(sodium dodecyl sulfate) 등의 상용화되어 판매되는 제품을 용이하게 사용할 수 있다. 구체적으로 적절한 농도로 희석시킨 세포 용해 세제를 일정시간 처리하여 수행될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 표적 세포가 결합된 앵타머 칩을 1% 트리톤 X-100(PBS 용액)으로 1시간 동안 처리하여 수행하였다.
- [0041] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 앵타머 칩의 재사용 방법에 제공되는 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머가 기판에 이황화결합에 의해 결합된 앵타머 칩을 제공한다.

[0042] 앵타머 칩에 대한 설명은 전술한 바와 동일하다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 방법은 표면에 특정 표적 단백질을 발현하는 세포의 검출 및 정량을 앵타머 기반 바이오 칩 위에서 간편하게 수행할 수 있으므로 경제적이다. 특히, 일반적인 세포 염색방법을 이용하여 쉽고 매우 간편하게 수행할 수 있고 값비싼 장비나 화학물질을 사용하지 않으므로 많은 비용을 필요로 하지 않는다. 또한 본 발명의 방법에 이용되는 바이오센서는 앵타머를 이용한 것으로 검출한계 및 배경신호가 낮아 고감도 검출능을 갖는 장점이 있다. 특히, 이항화결합을 통해 앵타머를 표면에 도입한 경우, 가교결합제 등을 이용한 공유결합 방식을 이용하여 앵타머를 고정시킨 칩과는 달리 이항화결합의 환원을 통해 칩의 재사용이 가능하므로 추가적인 비용 절감효과를 기대할 수 있다. 따라서, 본 발명의 앵타머 칩은 저렴한 비용으로 다양한 질환의 진단 및 의약품의 개발에 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명에 따른 앵타머 칩의 원리를 개략적으로 나타낸 도이다. 표면에 티올기를 갖도록 개질한 유리판 위에 5' 말단에 티올기를 포함하는 앵타머를 이항화결합을 통해 결합시킨다. 상기 앵타머로는 HER2 또는 PSMA 앵타머를 이용하였다.

도 2는 본 발명에 따른 앵타머 칩과 DAPI 염색법을 이용하여 표면에 특정 단백질을 발현하는 표적 세포의 검출 및 정량 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0046] 실시예 1: 시약 및 기기의 준비

[0047] 본 발명에서 사용된 화학물질은 공급회사로부터 구입하였고, 별도의 정제과정 없이 사용하였다. 그리고 모든 실험에서는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 탈이온수(deionized water)를 사용하였다. UV 흡광도는 Agilent 8453 UV-Visible spectrometer를 사용하여 측정하였다. 모든 실험은 2회 반복하여 수행하였다.

[0048] 실시예 2: 앵타머의 제조

[0049] 표면에 HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 또는 PSMA(prostate-specific membrane antigen)을 발현하는 세포에 특이적으로 결합하며 5' 말단에 티올기가 도입된 앵타머를 하기의 방법으로 제조하였다.

[0050] 먼저, HER2 단백질에 특이적으로 결합하는 RNA 앵타머는 3' 말단에 T7 프로모터 서열을 포함하는 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열(5'-AGC CGC GCC CTA CCC TAT CCC TCC CCT CGC GGC TCC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGT CC-3' 서열번호 1; 5'-GAT CCC CGC GGA AGC TTC ATT TTC TTG ACT AGT CGT GCC CTA CCC TAT CCC TCC CCT CAC AAC TTT TGG TAC CAC GCG TCC CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GTC C-3' 서열번호 2)과 Shin *et al.* 및 Kim *et al.*에 의해 개시된 방법(Shin *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, 20: 3322-3325; Kim *et al.*, Tet. Lett., 2010, 51: 3446-3448)을 이용하여 34량체(5'-AGC CGC GAG GGG AGG GAU AGG GUA GGG CGC GGC U-3' 서열번호 3) 및 82량체(5'-GGG ACG CGU GGU ACC AAA AGU UGU GAG GGG AGG GAU AGG GUA GGG CAC GAC UAG UCA AGA AAA UGA AGC UUC CGC GGG GAU C-3' 서열번호 4)를 얻었다(Nucleic Acid Therapeutics, 2011, 21: 173-178). 한편 PSMA 단백질에 3' 말단에 T7 프로모터 서열을 포함하는 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열(5'-TCG GGC GAG TCG TCT GCC GAT GAG GAT TGA CAA GGA GTG ACG TAA ACA TGG CTG ATC CGC ATC GTC CTC CCC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGT CC-3' 서열번호 5)과 Shin *et al.* 및 Kim *et al.*에 의해 개시된 방법(Shin *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, 20: 3322-3325; Kim *et al.*, Tet. Lett., 2010, 51: 3446-3448)을 이용하여 71량체(5'-GGG AGG ACG AUG CGG AUC AGC CAU GUU UAC GUC ACU CCU UGU CAA UCC UCA UCG GCA GAC GAC UCG CCC GA-3' 서열번호 6;

Biomaterials, 2011, 32: 2124-2132)를 얻었다. 상기 제조된 RNA 앵타머의 5' 말단에 효소를 이용하여 술포히드릴기(sulfhydryl group)를 도입하여 5'말단을 티올기(thiol group)으로 변형시켰다. 전사과정에 앞서 효과적인 전사과정의 진행을 위하여 구아노신을 필요로 하는 T7 RNA 중합효소의 기질로서 GSMP(5'-디옥시-5'-티오구아노신-5'-모노포스포로티오에이트; 5'-deoxy-5'-thioguanosine-5'-monophosphorothioate)를 합성(Kim *et al.*, Tet. Lett., 2010, 51: 3446-3448)하였다. 시험관 내(*In vitro*) 전사과정 후 알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase) 처리를 통해 RNA 분자의 5' 말단에 티올기를 도입하였다.

[0051] **실시예 3: 앵타머 칩의 제조**

[0052] 앵타머 칩은 기존 논문의 실험방법을 응용하여 준비하였다(Lee and Hah, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2012, 22: 1520-1522).

[0053] 간략하게 요약하자면, 유리 슬라이드(1.5 cm×2 cm)을 피라냐 용액(piranha solution; 상기 피라냐 용액은 전체 비율을 1로 했을 때, 0.3 비율로 30% H₂O₂ 용액, 0.7 비율로 H₂SO₄ 용액을 이용하였음; Stavyiannoudaki *et al.*, Anal. Bioanal. Chem., 2009, 395: 429-435)으로 80℃에서 1시간 동안 처리하여 표면을 깨끗하게 만들었다. 그 후, 실온으로 낮춘 다음에 슬라이드를 탈이온수를 이용하여 반복적으로 세척한 후에, 20분 동안 음파처리(sonication)를 하였다. 그리고, 유리 슬라이드를 1시간 동안 100℃ 오븐에서 건조시킨 후, 표면에 티올기를 갖도록 개질시키기 위하여 MPTMS((3-mercaptopropyl)trimethoxysilane)를 처리한 에탄올 용액(MPTMS:EtOH=1:20)에 담궈 두었다. 15분 후에 600 μl의 0.01 M NaOH 수용액을 MPTMS를 처리한 에탄올 용액에 넣어준 후 30분 동안 유지시켰다. 그리고 유리 슬라이드를 차례대로 탈이온수와 에탄올을 이용하여 반복적으로 세척하였다. 추가적으로 변형시키기 전에 실온에서 건조과정을 거쳤다. 표면 상에 티올기를 가진 유리 슬라이드 위에 1 μl의 5' 말단에 티올기가 도입된 RNA 용액(앵타머)을 점적(spotting)하고, 이황화결합을 형성시키기 위해 4℃에서 12시간 이상(overnight) 반응시켰다. 다음으로 PBS 용액(pH 7.4)를 이용하여 반복적으로 반응하지 않는 RNA를 제거하였다(도 1).

[0054] **실시예 4: DAPI 염색을 통한 앵타머 칩에 결합한 표적 세포의 검출 및 정량 분석**

[0055] 상기 실시예 3에 따라 제조된 앵타머 기반 칩의 세포 특이적 선택도와 감도를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 부유시켜 준비한 세포 현탁액을 비특이적 결합을 최소화하기 위하여 4℃에서 30분간 인큐베이션한 후, 준비된 세포 현탁액에 상기 앵타머 칩을 담그고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후 결합하지 않은 세포를 제거하기 위하여 PBS로 3회 세척하고, 0.1% 트리톤 X-100(PBS 용액)을 5분간 처리하여 세포 투과성을 부여하고(cell permeabilization), PBS로 3회 추가 세척하였다. 2 μg/ml 농도의 DAPI 용액으로 37℃에서 15분간 염색하고 PBS로 세척한 후 UV(365 nm)를 조사하여 발생하는 신호를 관찰하였다. 정량분석을 위해서는 발생하는 형광신호를 분광광도계를 이용하여 측정하여 수치화하였다.

[0056] 먼저, 유방암 세포에서 과발현되는 HER2 단백질에 선택적으로 결합하는 RNA 앵타머가 고정된 칩에 각기 다른 수준으로 HER2 단백질을 발현하는 6가지 암세포주(SK-BR-3, MDA-MB-453, MCF-7, LNCaP, PC3 및 HeLa)를 배양하여 동일한 수로 앵타머 칩에 적용하였다. 상기한 바와 같이 앵타머 칩과 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고 PBS로 3회 세척하여 결합하지 못한 세포를 제거하였다. 상기 세포와 반응시킨 앵타머 칩에 결합한 세포를 검출하고 정량하기 위하여 일반적으로 세포핵 염색에 사용되는 DAPI 염색법을 이용하였다. 그 결과를 도 2A에 나타내었다. 상기 방법으로 1시간 인큐베이션 시간 내에 10⁴ 개의 유방암 세포(SK-BR-3, MDA-MB-453 및 MCF-7)를 성공적으로 검출할 수 있었다. 이때, HER2 단백질을 발현하지 않는 전립선암 세포(LNCaP 및 PC3)와 자궁경부암 세포(HeLa)를 적용한 앵타머 칩에서는 DAPI 신호가 검출되지 않았다.

[0057] 또한, 전립선암 세포에서 과발현되는 PSMA 단백질에 선택적으로 결합하는 RNA 앵타머가 고정된 칩을 이용하여 각기 다른 수준으로 PSMA를 발현하는 전립선암 세포인 LNCaP 및 PC3에 대해 동일하게 실험을 진행하였다. 그 결과는 도 2B에 나타내었다. 이때는 PSMA를 과발현하는 LNCaP에서는 DAPI에 의한 강한 형광 신호를 검출할 수 있었으나, PSMA를 거의 발현하지 않는 PC3에 대해서 오직 약한 신호가 검출되었다.

[0058] 나아가 상기 서로 다른 정도로 PSMA를 발현하는 전립선암 세포를 다양한 비율로 혼합하여 앵타머 칩에 적용하고 DAPI로 염색하여 검출되는 신호를 확인하였다. 도 2C에 나타난 바와 같이, PSMA를 과발현하는 LNCaP 세포는 적용한 세포 수가 증가함에 따라 형광신호가 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, PSMA를 발현하지 않는 PC3 세포

에서는 세포 수가 10^6 까지 증가하여도 검출되는 신호는 거의 증가하지 않았다. 혼합 시료에 대해서는 LNCaP의 비율이 증가함에 따라 이에 비례하여 형광 신호가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

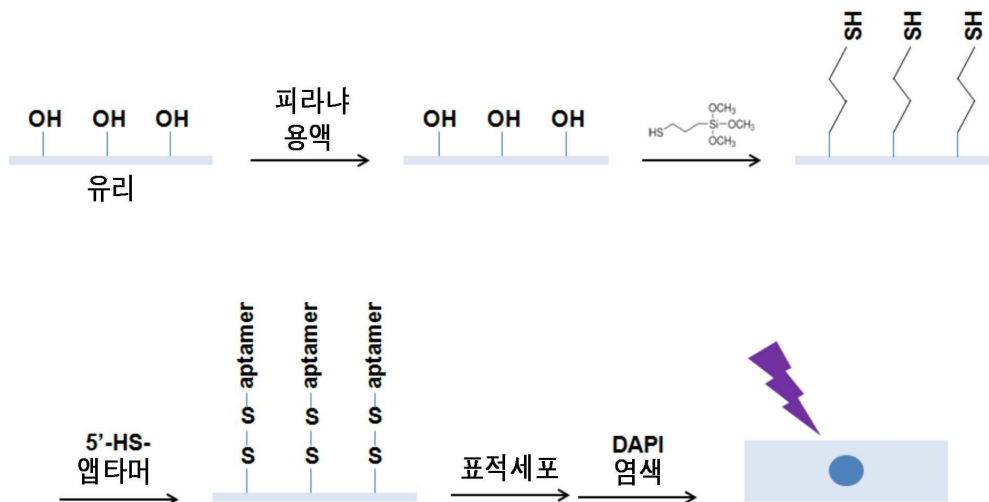
[0059] 따라서, 본 발명의 세포 검출 방법은 적절한 앵타머를 선정함으로써, 표적 세포를 10^3 세포의 낮은 수준에서도 효율적으로 검출할 수 있음을 확인하였으며, 혼합 세포 시료 중에서도 표적 세포만을 혼합 비율에 비례하여 효율적으로 검출해 낼 수 있음을 확인하여, 민감도 및 특이도가 높음을 확인하였다.

[0060] **실시예 5: 앵타머 칩의 재사용 확인**

[0061] 상기 실시예 3에 따른 본 발명의 앵타머 칩의 재사용 가능 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 4의 염색 및 검출 과정을 거친 앵타머 칩을 1% 트리톤 X-100(PBS 용액)으로 1시간 동안 처리하였다. 이후에 이황화결합의 환원을 위해 상기 앵타머 칩에 DTT(dithiothreitol)를 처리하고 PBS로 3회 세척한 후, 상기 실시예 3의 후반부에 기재된 방법으로 5'에 티올기가 도입된 RNA 앵타머를 칩에 다시 고정화시켰다. 재생성된 앵타머 칩을 표적 세포와 다시 반응시켰다.

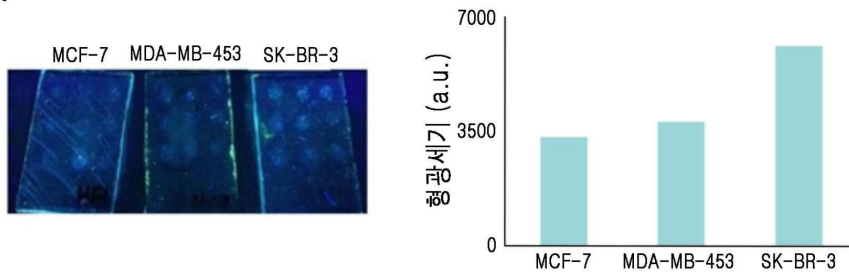
도면

도면1

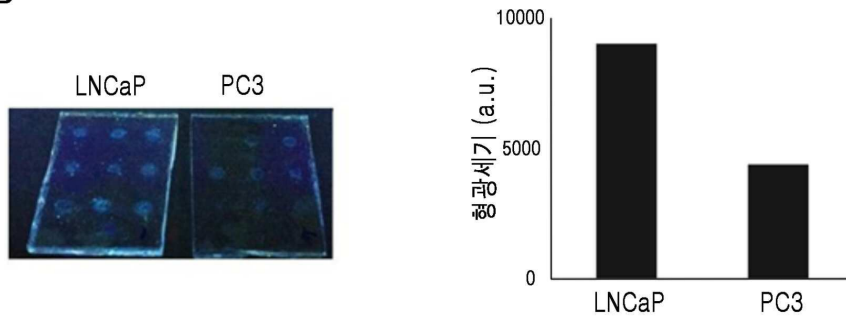


도면2

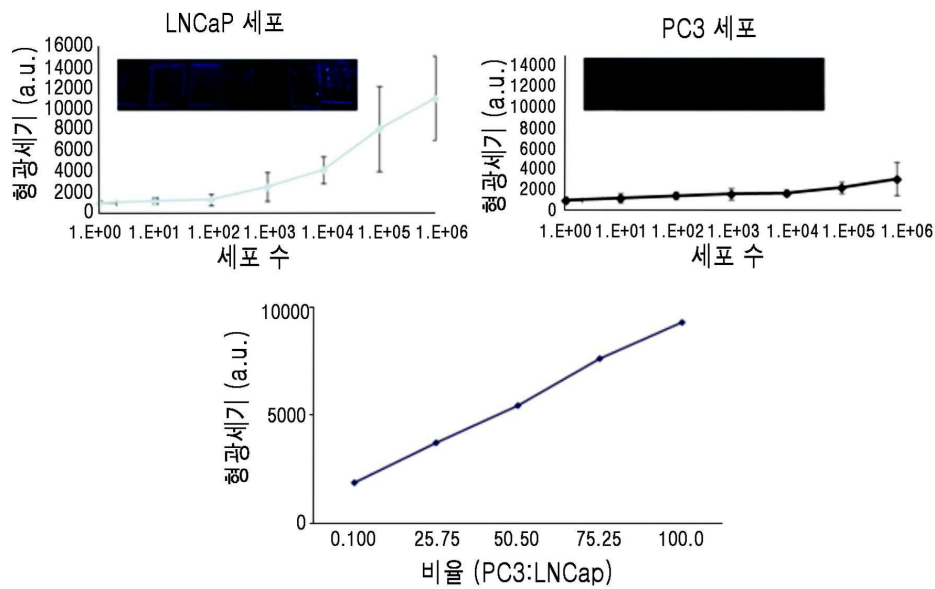
A



B



C



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A method for detecting and quantifying target cells
- <130> PA120839/KR
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for mini-HER2 RNA aptamer

<400> 1

agccgcgcc taccctatcc ctcccctcgc ggctccccta tagtgagtcg tattagtc 59

<210> 2

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for full-length HER2 RNA aptamer

<400> 2

gatccccgcg gaagcttcat tttcttgact agtcgtgccc taccctatcc ctcccctcac 60

aacttttggt accacgcgtc cccctatag tgagtcgtat tagtcc 106

<210> 3

<211> 34

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mini-HER2 RNA aptamer

<400> 3

agccgcgagg ggagggauag gguagggcgc ggcu 34

<210> 4

<211> 82

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> full-length HER2 RNA aptamer

<400> 4

gggacgcgug guacaaaaag uuugagggg agggauaggg uagggcacga cuagucaaga 60

aaaugaagcu uccgcgggga uc 82

<210> 5

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for PSMA RNA aptamer

<400> 5
 tcgggcgagt cgtctgccga tgaggattga caaggagtga cgtaaacaatg gctgatccgc 60
 atcgtcctcc cccctatagt gagtcgtatt agtcc 95
 <210> 6
 <211> 71
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PSMA RNA aptamer
 <400> 6
 gggaggacga ugcggaucag ccauguuuac gucacuccuu gucaauccuc aucggcagac 60
 gacucgccccg a 71