

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0124267 (43) 공개일자 2013년11월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/115 (2010.01) C12Q 1/68 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2013-0127535(분할)	(22) 출원일자 2013년10월25일 심사청구일자 2013년10월25일	(72) 발명자 구만복 서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3
(62) 원출원 특허 10-2012-0014920 원출원일자 2012년02월14일 심사청구일자 2012년02월14일		누를 하늬 빈티 아마드 라스톤 서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 생명과 학대학 녹지캠퍼스 543호 권영섭 서울특별시 동대문구 무학로42길 14-4 102호 (용 두동)
		(74) 대리인 이처영, 장제환

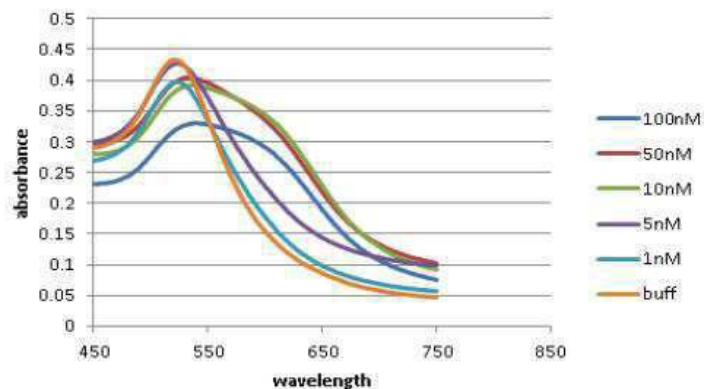
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 종래 앵타머에 비하여 고민감도로 특이적으로 테트라사이클린계 화합물에 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 이를 이용한 테트라사이클린계 화합물의 검출 및 분리방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머는 기존의 앵타머에 비하여 1000배 이상으로 감도가 증가되어 식품 등 시료 중 극히 미량으로 존재하는 테트라사이클린계 화합물의 검출 및 분리를 가능하게 하는 장점이 있다. 아울러, 기존 앵타머들이 60-96 base 정도의 길이였던 것과 달리 8mer 및 18mer의 극히 짧은 길이의 앵타머로서 테트라사이클린계 화합물을 특이적으로 검출할 수 있는바, 앵타머 합성 시 효율적인 비용 절감이 가능하다. 아울러, 하나의 앵타머로서 같은 계열의 항생물질 여러 종을 한번에 탐지가능한 바 실생활 응용 시 더욱 유용하다.

대표도 - 도8



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 3 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는, 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머:

여기서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 함.

청구항 2

제1항의 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물의 검출방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물은 물, 토양, 공기, 식품, 폐기물, 동식물 장내 및 동식물 조직 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물의 검출용 조성물.

청구항 5

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물의 검출용 센서.

청구항 6

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물의 검출용 키트.

청구항 7

제1항의 핵산 앵타머를 이용하는 것을 특징으로 하는 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물의 분리방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 핵산 앵타머가 고정된 비드가 충전된 컬럼에 시료를 통과시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물의 분리용 조성물.

청구항 10

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린으로 구성되는 군에서 선택된 화합물의 분리용 키트.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 종래 앵타머에 비하여 고민감도로 특이적으로 테트라사이클린계 화합물에 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 이를 이용한 테트라사이클린계 화합물의 검출 및 분리방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 테트라사이클린(tetracycline) 그룹은 매우 광범위하게 사용되는 항생제 중 하나이다. 이것은 동물용 약품으로 일반적으로 사료 첨가물 또는 성장 촉진인자로 사용되어 사육동물의 성장률을 높이는 데 이용되거나 우력, 광어 등의 양식 수산물, 축산물의 감염 예방 차원에서 직접 투여되기도 한다. 그러나 문제되는 점은 동물의 사료 찌꺼기나 배설물에 들어있던 잔류 TCs가 토양이나 물에 흡수되어 있다가 환경에서의 여러 경로를 통하여 사람에게 까지 영향을 줄 수 있다는 것이다. 특히 임신부나 소아에게 미치는 영향으로는 치아와 뼈가 황갈색으로 변할 수 있고, 태아의 골격발육을 지연시켜 기형아 출산 위험성이 높은 것으로 알려지고 있다.

[0003] 또한 Tetracycline 등의 항생제가 잔류되어 있는 축수산물을 장기간 섭취할 경우에 생체 내에 내성이 생겨 면역력을 떨어뜨리는 등 부작용이 생길 수 있다. 다시 말해 동물들에 대한 항생제 오남용으로 인해 일반적인 식중독균이 ‘다제내성균’ (슈퍼박테리아)이 되어버린다면, 일반적으로 사용하는 항생제로는 식중독을 치료할 수 없게 된다는 것이고 이를 낮게 하기 위해서 더 독한 항생제를 투여하는 악순환이 반복되는 것이다. 따라서 항생제의 오남용을 방지하는 것은 물론이고 식품의 안전성을 확보하기 위해 잔류되어 있는 항생제를 검출해 내는 방법을 개발하는 것 또한 필요한 실정이다.

[0004] 그러나 기존의 잔류항생제 검출방법은 잔류 항생제가 녹아있는 성분에 따라 각기 다른 시험용액을 조제하여 잔류항생제를 추출, 정제하여 액체크로마토그래피로 정량하는 방법을 사용한다. 또한, 기존의 방법은 녹인 물질에 따른 시험법도 소수이며, 시험용액을 각기 조제하는 데에도 번거로우며, 추출, 정제 과정 중에 타겟물질의 손실이 있을 수도 있으므로 정확한 정량이 어려운 단점이 있었다. 아울러, 기존의 잔류항생제 검출은 식품이나 물에만 적합하였다. 이에 이러한 문제점들을 해결한 새로운 잔류 항생제 검출 방법의 개발이 요구되었다.

[0005] 한편, 앵타머(aptamer)는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA의 구조체를 말한다. 앵타머는 센서 분야에서 이용되는 기존의 감지물질인 항체보다도 훨씬 타겟에 대한 친화도가 높고, 열안정성이 우수하며 시험관내(in vitro)에서 합성이 가능하기 때문에, 동물에게 항원을 주입하여 항체를 얻어낼 필요가 없어 비용 면에서 훨씬 우위에 있으며, 타겟물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자나 환경호르몬이나 항생제 같은 작은 유기화학 물질, 박테리아 등의 다양한 타겟에 대한 앵타머를 합성할 수 있다. 이렇게 표적 물질과 특이적으로 결합하는 앵타머의 특성으로 인해 최근 들어 앵타머를 신약개발, 약물전달 시스템 그리고 바이오센서 등의 연구에 이용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다. 따라서 앵타머는 극미량의 잔류항생제의 검출방법에 도입하기에 매우 적절한 물질이며, 이를 활용한 나노바이오 기술을 이용하여 다른 특정 물질을 검출하는데도 응용할 수 있다. 그러나, 기존의 앵타머 개발은 대부분 의료 진단용 바이오센서 개발이나 신약 개발에 사용하기 위해 단백질을 질병 관련 표적물질로 하는 앵타머 연구가 주된 목표였다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 노력한 결과, 항생물질의 대표적인 테트라사이클린 계열에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보일 뿐 아니라 종래 앵타머에 비하여 1000배 이상의 고

감도로 테트라사이클린계 화합물을 검출할 수 있는 앵타머를 제작하고 이를 이용하여 식품, 상하수원, 인체 등 으로부터 잔류 항생물질을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함 하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 저분자 물질인 테트라사이클린계 화합물을 검출할 수 있으면서도 종래 앵타머에 비하여 감도 가 증가된 핵산 앵타머 및 그 용도를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는, 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머를 제공한다:

[0010] 여기서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 함.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 테트라사이클린계 화합물의 검출방법 을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린계 화합물의 검출용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린계 화합물의 검출용 센서를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린계 화합물의 검출용 키트를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 이용하는 것을 특징으로 하는 테트라사이클린계 화합물의 분리방법을 제공 한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린계 화합물의 분리용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 테트라사이클린계 화합물의 분리용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머는 기존의 앵타머에 비하여 1000배 이상 으로 감도가 증가되어 식품 등 시료 중 극히 미량으로 존재하는 테트라사이클린계 화합물의 검출 및 분리를 가 능하게 하는 장점이 있다. 아울러, 기존 앵타머들이 60-96 base 정도의 길이였던 것과 달리 8mer 및 18mer의 극 히 짧은 길이의 앵타머로서 테트라사이클린계 화합물을 특이적으로 검출할 수 있는바, 앵타머 합성 시 효율적인 비용 절감이 가능하다. 아울러, 하나의 앵타머로서 같은 계열의 항생물질 여러 종을 한번에 탐지가능한 바 실생 활 응용 시 더욱 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 앵타머 및 염 유도 금 나노입자 응집현상을 이용하여 타겟물질을 검출하는 원리를 설명하는 개략도이다.

도 2는 A 타입 앵타머의 2차 구조이다.

도 3은 B 타입 앵타머의 2차 구조이다.

도 4는 C 타입 앵타머의 2차 구조이다.

도 5는 생성한 금 나노입자를 TEM으로 확인한 사진이다.

도 6은 11종의 앵타머의 테트라사이클린계 화합물 검출여부를 확인하기 위하여, 금나노입자의 UV 흡광도를 측정한 결과 그래프이다.

도 7은 앵타머 C3를 이용하여 표적 물질의 농도를 달리하여 금 나노입자의 색 변화를 관찰한 사진이다.

도 8은 앵타머 C3를 이용하여 표적 물질의 농도를 달리하여 금 나노입자의 UV 흡광도를 측정한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0021] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0022] 본원에서 "핵산 앵타머"란, 높은 친화성으로 타겟물질을 특이적으로 인지할 수 있는 작은 단일가닥 올리고핵산을 말한다.
- [0023] 본원에서 "시료"란, 테트라사이클린계 화합물을 함유하거나 함유하고 있는 것으로 추정되어 분석이 행해질 조성을 의미하며, 액체, 토양, 공기, 식품, 폐기물, 동식물 장내 및 동식물 조직 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 액체는 물, 혈액, 소변, 눈물, 땀, 타액, 림프 및 뇌척수액 등임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 물은 강수(江水), 해수(海水), 호수(湖水) 및 우수(雨水) 등을 포함하고, 폐기물은 하수, 폐수 등을 포함하며, 상기 동식물은 인체를 포함한다. 또한, 상기 동식물 조직으로는 점막, 피부, 외피, 털, 비늘, 안구, 혀, 뼈, 발굽, 부리, 주둥이, 발, 손, 입, 유두, 귀, 코 등의 조직을 포함한다.
- [0024] 본원에서, 테트라사이클린계 화합물이란 테트라사이클린계 항생물질로서 예시적으로 테트라사이클린, 독시사이클린 또는 옥시테트라사이클린을 의미한다.
- [0025] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는, 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머에 관한 것이다.
- [0026] 앵타머 A1: 5'-CGC TGG TG-3' (서열번호 1)
- [0027] 앵타머 A2: 5'-CGG TGG TG-3' (서열번호 2)
- [0028] 앵타머 C2: 5'-GTG TTG TGG GCG TTG TGT-3' (서열번호 3)
- [0029] 앵타머 C3: 5'-GTG TTG CGG GTG TGG TGT-3' (서열번호 4)
- [0030] 핵산 앵타머는 단일가닥 DNA 또는 RNA로서 제공되는 것으로서, 본 발명에서 상기 핵산이 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U로 표시되며, 이러한 서열이 본 발명의 범위에 포함됨은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 자명한 사항이라 할 것이다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서는 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머를 제작하기 위하여, 종래의 앵타머보다 더 짧은 앵타머 서열들을 예측 합성한 다음, 이에 대하여 염 유도 금 나노입자 응집 현상을 이용하여 테트라사이클린계 화합물 특이적 앵타머를 선별하였다. 즉, 도 1에 나타난 바와 같이, 금 나노입자는 표면에 앵타머가 흡착되어 있는 경우 염이 존재하여도 응집 반응이 일어나지 않으나 금 나노입자에 흡착된 앵타머가 특이적으로 결합하는 타겟이 함께 존재하는 경우 앵타머가 금 나노입자의 표면으로부터 떨어져 나와 타겟과 결합하면서 금 나노입자가 응집하는 것을 이용하였다. 염 첨가 시 응집 현상에 의하여 금 나노입자 사이의 거리가 가까워지면 색 변화가 이루어지게 된다. 본 발명의 실시예에서는 앵타머 A1 및 A2는 대조군으로 사용된 다이클로페낙이나 글라이포세이트에 비하여 테트라사이클린계 화합물인 테트라사이클린, 독시사이클린 및 옥시테트라사이클린 모두 특이적으로 검출할 수 있고, 앵타머 C2 및 C3의 경우 테트라사이클린계 화합물 중 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린에 대하여 매우 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머로서 앵타머 A1, A2, C2, C3를 선정하였다.

- [0032] 아울러, 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 선정된 앵타머의 검출 한계를 실험한 결과, 육안으로는 10nM 까지 관찰가능하고, 분광기로는 5nM까지 검출가능하여 종래의 앵타머 대비 민감도가 약 1000배 증가되었음을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 앵타머는 민감도가 매우 향상되어 식품이나 물 등에 극히 미량 존재하는 테트라사이클린계 항생물질의 검출에 적합하다.
- [0033] 본 발명은 또 다른 관점에서 앵타머를 이용한 테트라사이클린계 화합물의 검출방법에 관한 것이다. 상기 테트라사이클린계 화합물은 물, 토양, 공기, 식품, 폐기물, 동식물 장내 및 동식물 조직 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 상기 물은 강수(江水), 해수(海水), 호수(湖水) 및 우수(雨水) 등을 포함하고, 폐기물은 하수, 폐수 등을 포함하며, 상기 동식물은 인체를 포함한다.
- [0034] 본 발명의 다른 실시예에서는 염 유도 금 나노입자 응집현상을 이용하여 본 발명에 따른 앵타머가 특이적으로 테트라사이클린계 화합물에 결합함을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 상기 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 테트라사이클린계 화합물 검출용 조성물에 관한 것이다. 아울러, 상기 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머는 칩 등 기관에 고정되어 테트라사이클린계 화합물 검출용 센서의 형태로 제공될 수 있다.
- [0035] 상기 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 검출 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 테트라사이클린계 화합물 검출용 키트는 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 테트라사이클린계 화합물만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 테트라사이클린계 화합물의 분리용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.
- [0037] 본 발명은 또 다른 관점에서, 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 테트라사이클린계 화합물의 분리방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 테트라사이클린계 화합물이 포함된 시료를 통과시켜 테트라사이클린계 화합물을 분리할 수 있다.

[0038] 실시예

- [0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

[0040] 앵타머의 합성

- [0041] 테트라사이클린계 화합물에 결합하는 앵타머들을 분리한 다음, 이들의 서열을 분석하고 이들 서열을 변형시켜 A 타입 (8mer), B 타입 (11mer) 및 C 타입(18mer)의 새로운 앵타머 서열들을 예측, 합성하였다. 이때, 하기의 새로운 앵타머 서열의 발굴에는 선별된 앵타머 서열에서 특정 분자에 대한 높은 결합력을 지니는 특정 서열만을 알아내고 불필요한 서열을 제거하기 위하여, truncation 을 수행하였다. 합성한 각 앵타머의 2차 구조는 도 2 내지 4와 같다.

표 1

서열번호	앵타머	염기서열 (5'-3')
1	A1	CGC TGG TG

2	A2	CGG TGG TG
5	B1	TGG TGT TGT GT
6	B2	CGG TGT GGT GG
7	C1	GTG TTG TGG GTG TTG TGT
3	C2	GTG TTG TGG GCG TTG TGT
4	C3	GTG TTG CGG GTG TGG TGT
8	C4	GTG TTG CGG GTG TTG TGT
9	C5	GTG TGG TGG GTG TTG TGT
10	C6	GGG TTG TGG GTG TGG TGT
11	C7	GGG TGG CGG GCG TGG TGT

실시예 2

[0043] 앵타머 흡착 금 나노입자를 이용한 색도 분석

[0044] 실시예 1의 앵타머가 특이적으로 테트라사이클린계 화합물을 검출할 수 있는지 확인하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

[0045] 2-1: 비 고정화 방식 앵타머 흡착 금 나노입자의 제조

[0046] 비 고정화 방식 앵타머 흡착 금나노입자를 만드는데 이용하기 위해 시트로산염 (citrate)로 안정화된 금나노입자를 생성하였다. 큰 비커에 HCl과 HNO₃를 3:1 비율로 섞어서 왕수를 만들어 준비한 뒤, 금나노입자를 만드는데 사용할 200 ml 플라스크와 자석을 적어도 15분 이상 담가두어 오염물질을 제거하였다. 위와 같이 준비한 플라스크에 3차 증류수를 98 ml 넣고 핫플레이트 위에서 저어주면서(stirring) 50 mM의 HAuCl₄ 용액을 2 ml 첨가하여 HAuCl₄의 최종 농도가 1 mM이 되도록 하였다. 이 용액이 끓기 시작하면 빠르게 38.8 mM의 시트르산나트륨 (sodium citrate) 용액을 10 ml 첨가하였다. 그러면 용액의 색이 밝은 노란색에서 짙은 붉은색으로 1분 안에 변화하였다. 20분 더 끓인 뒤에는 상온에서 식을 때까지 stirring 하면서 놔두었다. 이 용액은 0.45 um nitrocellulose 필터 페이퍼를 이용하여 여과하여 만드는 과정에서 응집된 금나노입자 혹은 그 외의 불순물을 제거하였다. 도 5에서 제시한 바와 같이, 생성된 금나노입자는 TEM (Transmission Electron Microscopy)을 이용하여 크기와 모양을 확인하였다. 완성된 금나노입자는 4 °C에 냉장 보관하였다.

[0047] 2-2: 테트라사이클린계 화합물 특이적 앵타머의 선별

[0048] 금나노입자를 보관할 두 개의 vial은 12 M NaOH에 1 시간 이상 담가둔 뒤 증류수(DW)로 씻어서 준비하였다. 2nM의 금나노입자와 실시예 1의 500nM의 테트라사이클린 계열 앵타머들을 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer pH 7.6 contained 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCL, 1mM CaCl₂)에 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 250uM의 테트라사이클린(tetracycline), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 독시사이클린(Doxycycline) (이하 테트라사이클린계 화합물)과, 양성대조군으로서 다이클로페낙, 글라이포세이트를 각각 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그 다음 상기 용액에 0.1M NaCl을 첨가하여 염 유발 금 뭉침 현상(salt induced gold aggregation)을 유도하여 UV/VIS 분광기 (Ultrospec 6300 pro, GE health care, USA)를 이용하여 금나노입자의 UV 흡광도를 측정하였다.

[0049] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 검출한도인 650/520 ratio 값 0.2를 기준으로 살펴본 결과, 앵타머 A1 및 A2는 대조군으로 사용된 다이클로페낙이나 글라이포세이트에 비하여 테트라사이클린계 화합물인 테트라사이클린, 독시사이클린 및 옥시테트라사이클린 모두 특이적으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다. 아울러, 앵타머 C2 및 C3의 경우 테트라사이클린계 화합물 중 테트라사이클린 및 옥시테트라사이클린에 대하여 매우 특이적으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이에 본 발명에 따른 테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 앵타머로서 앵타머 A1,A2,C2,C3를 선정하였다.

실시예 3

[0050] 테트라사이클린계 화합물의 검출한계 측정

[0051] 테트라사이클린 검출 한계 농도를 알아보기 위하여, 앵타머 C3와 테트라사이클린을 선정하여, 테트라사이클린의 농도에 변화를 주며 금나노입자의 색변화를 관찰하였다.

[0052] 금나노입자를 보관할 두 개의 vial은 12 M NaOH에 1 시간 이상 담가둔 뒤 증류수(DW)로 씻어서 준비하였다. 2nM의 금나노입자와 500nM의 테트라사이클린 계열 앵타머 C3를 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer pH 7.6 contained 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCL, 1mM CaCl₂)에 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 0nM~100nM의 테트라사이클린을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 상기 용액에 0.1M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도하여 금나노입자의 UV 흡광도를 측정 테트라사이클린 검출 한계 농도를 분석하였다.

[0053] 그 결과, 육안으로 관찰한 경우에는, 도 7에 나타난 바와 같이, 10nM까지도 테트라사이클린의 검출이 가능하였으며, UV/VIS 분광기로 관찰한 경우에는 도 8에 나타난 바와 같이, 5nM까지 검출이 가능한 것으로 나타나 극히 민감도가 높은 것으로 나타났다. 이는 실시예 1에서 본 발명에 따른 앵타머 제작을 위하여 사전 분리한 테트라사이클린 특이적 앵타머를 이용한 경우에 비하여 민감도가 약 1000배 이상 증가한 수치이다.

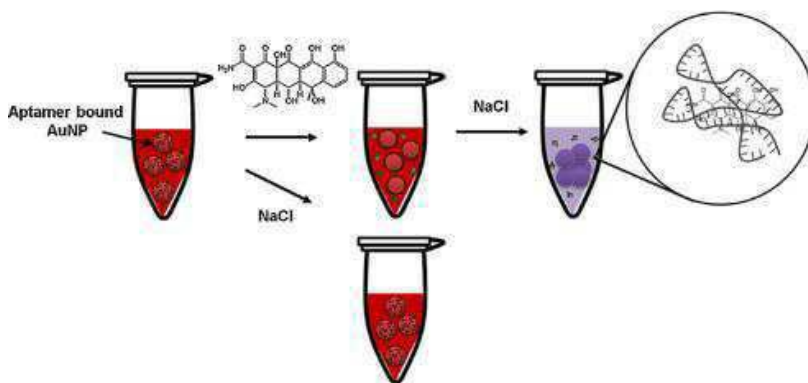
[0054] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

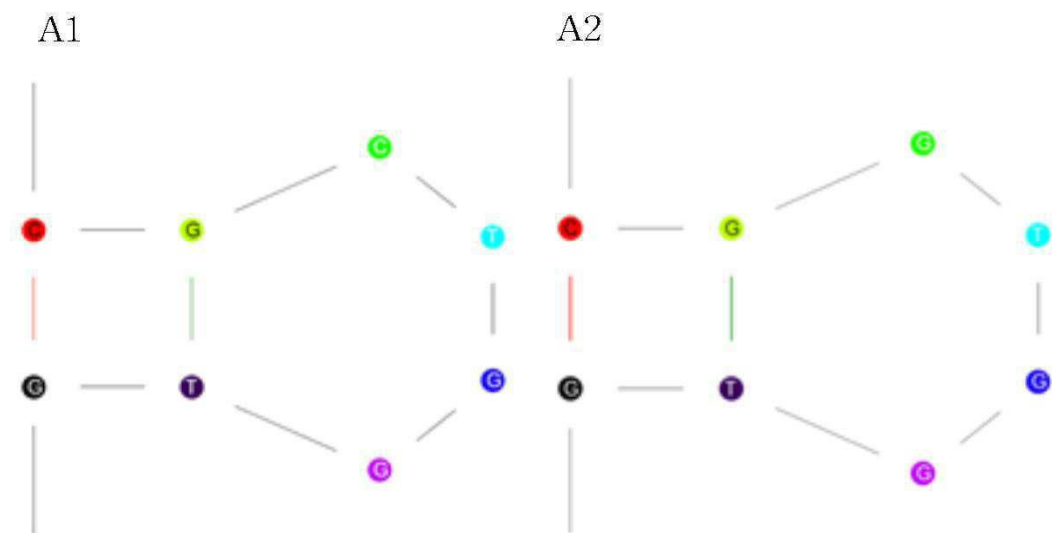
[0055] 부호 없음

도면

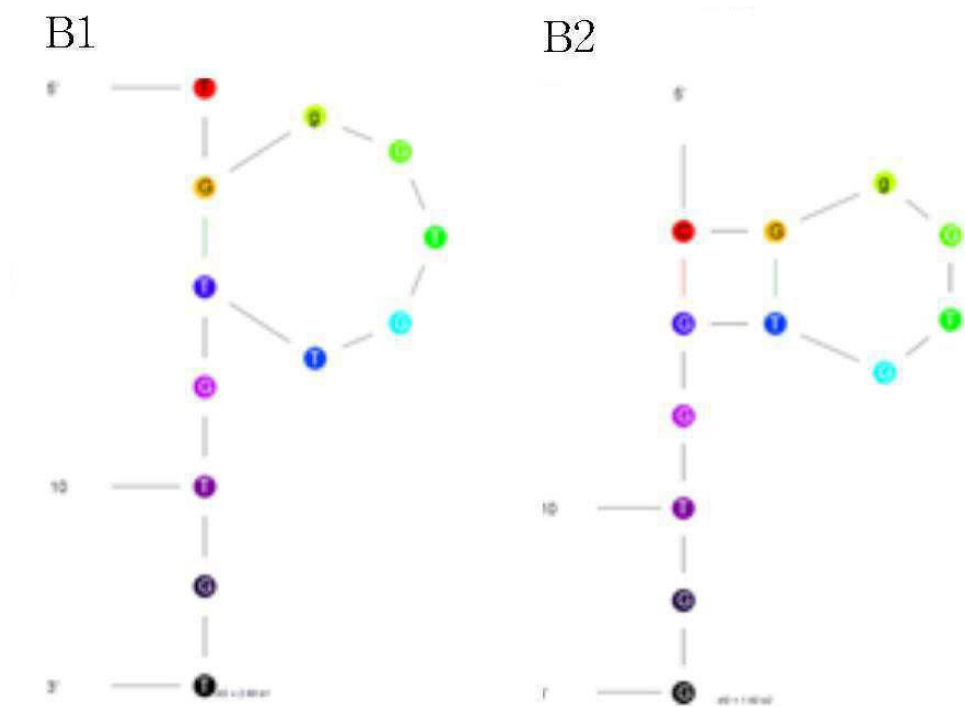
도면1



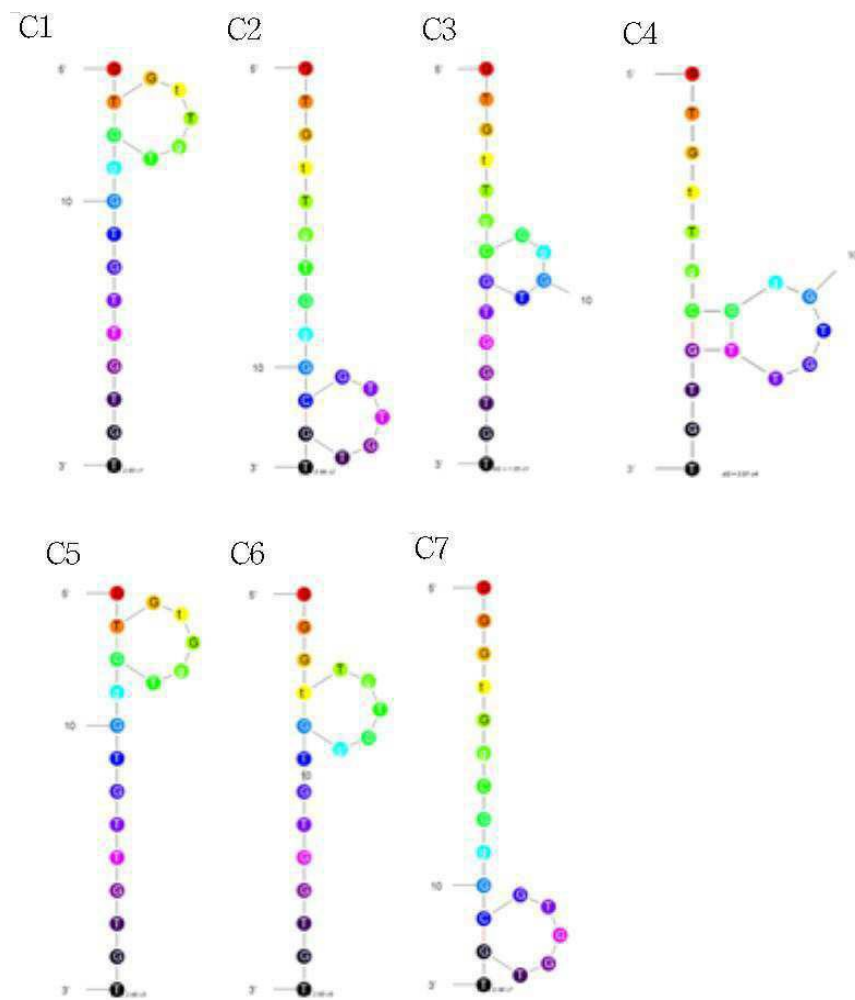
도면2



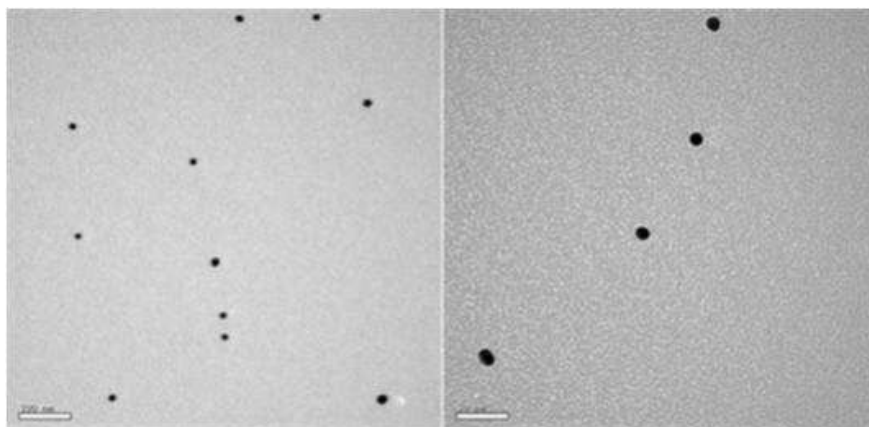
도면3



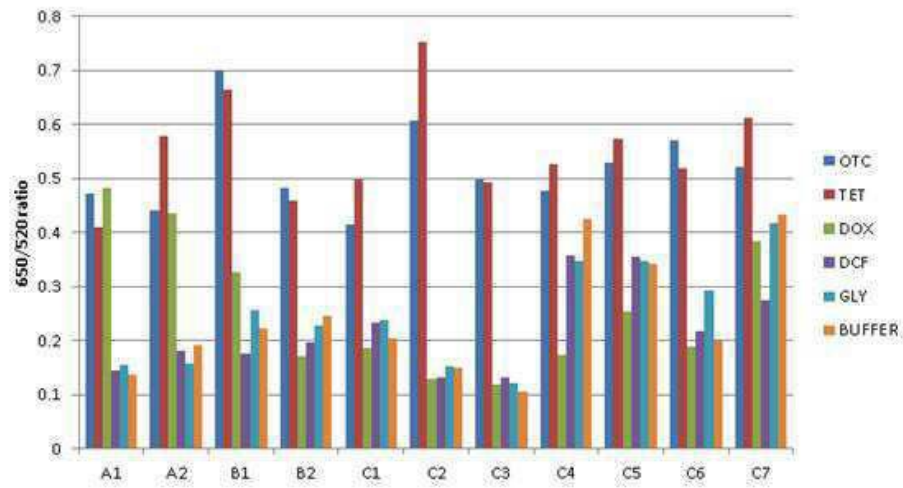
도면4



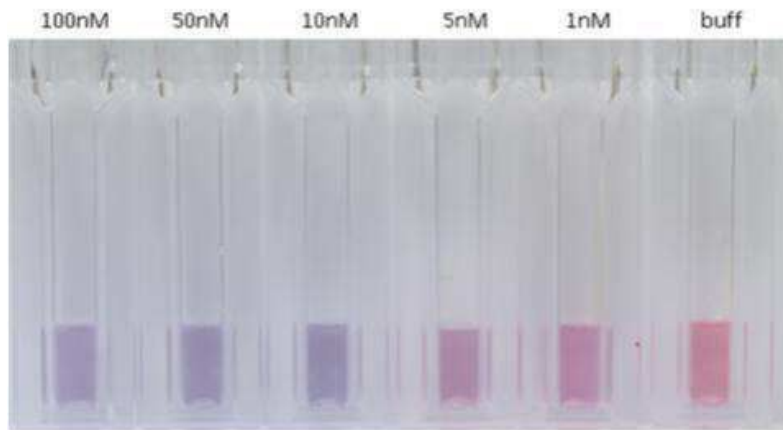
도면5



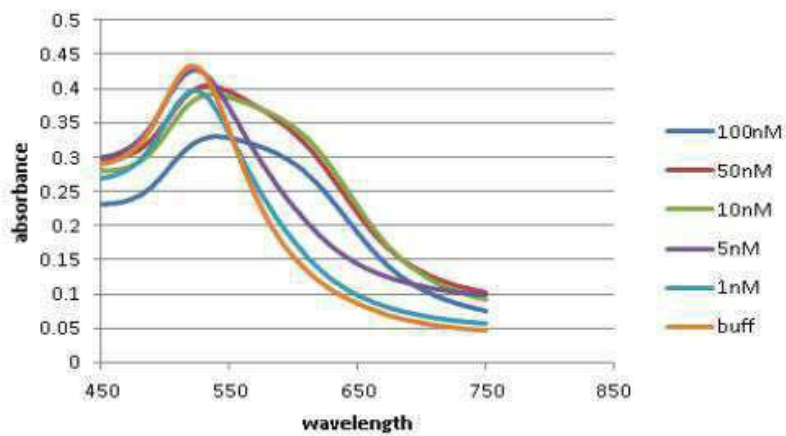
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Nucleic Acid Aptamer Capable of Specifically Binding to
Tetracyclines Compound and Use thereof

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer A1

<400> 1

cgctggtg 8

<210> 2

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer A2

<400>

> 2

cggtggtg 8

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer C2

<400> 3

gtgttggtggg cggttgtgt 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer C3

<400> 4

gtgttgctggg tgttgtgt 18

<210> 5

<211> 11

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer B1	
<400>	5	
	tggtgttgtg t	11
<210>	6	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer B2	
<400>	6	
	cgggtgttgtg g	11
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer C1	
<400>	7	
	gtgttgtggg tgttgtgt	18
<210>	8	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer C4	
<400>	8	
	gtgttgcggg tgttgtgt	18
<210>	9	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer C5	
<400>	9	
	gtgtgtggg tgttgtgt	18

<210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aptamer C6
 <400> 10
 gggttgtggg tgttgtgt 18

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aptamer C7
 <400> 11
 gggtggcggg cgttgtgt 18