

(11) 공개번호 10-2013-0044981
(43) 공개일자 2013년05월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)

이수진
서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 녹지 543호 (안암동5가, 고려대학교)

권영섭
서울특별시 성북구 인촌로 110-29, 103호 (안암동5가)

(74) 대리인
특허법인다나

(54) 발명의 명칭 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머

본 발명은 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선택된 글라이포세이트에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머 및 상기 DNA 앵타머를 이용한 글라이포세이트의 검출방법에 관한 것이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 GR070045

부처명 서울특별시

연구사업명 기술기반 구축사업

연구과제명 안전한 식수확보를 위한 신속 정확한 휴대형 유해물질 검출시스템 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009.08.01 ~ 2011.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 26에 기재된 염기서열 중 어느 하나를 포함하는 글라이포세이트(Glyphosate)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머.

청구항 2

제 1 항의 DNA 앵타머를 포함하는 글라이포세이트(Glyphosate) 검출용 조성물.

청구항 3

제 1 항의 DNA 앵타머를 이용한 글라이포세이트의 검출방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 글라이포세이트는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동식물 장내 및 동식물 조직 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 글라이포세이트의 검출방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

금 나노입자 기반의 색도 분석으로 검출하는 글라이포세이트의 검출방법.

청구항 6

제 1 항의 DNA 앵타머를 포함하는 글라이포세이트(Glyphosate) 검출센서.

청구항 7

제 1 항의 DNA 앵타머를 포함하는 글라이포세이트(Glyphosate) 검출키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 글라이포세이트(glyphosate)는 매우 광범위하게 사용되는 포스포노아미노산(Phosphono amino acid)계 비선택적 제초제중의 하나로서 상대적으로 포유류에 낮은 독성을 가지고 있기 때문에 가장 많이 사용하고 있는 농약 중 하나이다. 그러나 문제되는 점은 제초제의 광범위한 사용으로 인해 환경오염을 야기할 수 있다는 것이다. 더 나아가 인간에게 영향을 끼칠 수 있으며 이는 메스꺼움, 구토, 인두통, 복통과 심한 설사, 구토에 의한 탈수성 쇼

크, 대사성 산성증(Acidosis), 혈압저하, 궤뇨 등으로 나타난다.

[0003] 또한, 글라이코세이트 등의 농약이 잔류되어 있는 농축수산물을 장기간 섭취할 경우에 내장기능 이상, DNA 손상, 신경계와 발달에 해독을 끼치며 암, 기형아 출산, 유산 등이 일어날 수 있다. 따라서 제초제의 오남용을 방지하는 것은 물론이고 식품의 안전성을 확보하기 위해 토양, 수질, 농수산물에 잔류되어 있는 농약을 검출해 내는 방법을 개발하는 것 또한 필요한 실정이다.

[0004] 앵타머(aptamer)는 10^{12-14} 정도의 다양성을 가지는 랜덤 핵산 라이브러리로부터 얻어지는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA 분자 구조체를 말한다. 또한, 앵타머는 센서 분야에서 이용되는 기존의 감지물질인 항체와는 달리 핵산구조체 이므로 열 안정성이 우수하며, 시험관 내(in vitro)에서 합성되기 때문에, 동물이나 세포가 따로 필요하지 않아 생산 비용 면에서도 경제적이며, 타겟 물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자 물질부터 환경호르몬, 항생제, 잔류 의약품 등의 저분자 유기화학 물질, 박테리아, 바이러스 등의 다양한 타겟에 대한 앵타머를 합성할 수 있다. 따라서, 다양한 타겟 물질에 대한 앵타머가 만들어지고 있으며, 표적 물질과 특이성과 강한 친화도를 가지고 결합하는 앵타머의 특성으로 인해 최근 들어 앵타머를 신약 개발, 약물 전달 시스템 그리고 바이오센서 등에 응용하는 많은 연구가 이루어지고 있다. 따라서, 앵타머는 극미량의 잔류 농약의 검출방법에 도입하기에 매우 적절한 물질이며, 이를 활용한 나노 바이오 기술을 통해 특정 잔류 농약 물질을 검출하는데도 응용할 수 있다.

[0005] 금 나노입자 기반의 색도진단법은 그 준비의 편리성과 간단한 작동법 그리고 육안으로 색 변화를 관찰할 수 있다는 점에서 최근 들어 온사이트(on-site) 탐지의 새로운 대안으로 떠오르고 있다[비특허문헌 1]. 이러한 금 나노입자 기반 앵타 센서에는 두 가지 종류가 있는데 하나는 금 나노입자 표면을 변형하여 앵타머를 금 나노입자 표면에 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 두 개 이상의 금 나노입자 거리가 서로 가까워짐으로 인해 응집(aggregation)이 일어나서 금 나노입자 용액의 색이 붉은색에서 푸른색 계열로 변하는 특징을 이용한 것이고, 다른 하나는 변형되지 않은 금 나노입자 표면에 앵타머가 물리적으로 흡착되어 있다가 타겟 물질이 있을 때 흡착되어 있던 앵타머와 타겟과의 결합으로 인해 금 나노입자의 표면에서 떨어져 나오는 현상에 의해 색이 변하는 특징을 이용하는 것이다.

[0006] 순수한 금 나노입자의 용액 색은 붉은색이고, 앵타머가 물리적으로 금 나노입자에 흡착이 된 후 타겟을 넣어주면, 앵타머와 타겟 간의 친화도가 앵타머와 금 나노입자 간의 친화도보다 크기 때문에 앵타머는 타겟과 결합하게 된다[비특허문헌 2]. 이때, NaCl을 첨가해두면 타겟을 첨가해준 튜브에서는 금 나노 입자가 뭉치게 되면서 색깔 변화를 관찰할 수 있다. 반면, 타겟이 없는 튜브에서는 앵타머가 NaCl로 인한 금 나노 입자의 응집(aggregation)을 방해하기 때문에, 색 변화를 관찰할 수 없다. 이러한 특성을 바탕으로 앵타머-금 나노입자를 이용하여 타겟 물질을 검출할 수 있다. 또한, 금 나노입자 용액을 UV 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하면, 순수한 금 나노입자 용액은 520 nm에서 가장 높은 흡광도를 보이는 반면에 색이 푸른 계열로 변한 후에는 650 nm에서 가장 높은 흡광도를 보이게 된다. 따라서 650 nm에서의 흡광도 값을 520 nm에서의 흡광도 값으로 나눈 값은 타겟에 의해 응집(aggregation)이 일어난 정도와 비례해서 증가한다.

[0007] 기존의 잔류 농약 검출방법은 잔류 농약이 녹아있는 성분에서 따라 각기 다른 시험용액을 조제하여 잔류 농약을 추출, 정제 후 액체 크로마토그래피를 이용해 정량하는 방법을 주로 사용한다. 그러나, 기존의 방법은 녹인 물질에 따른 시험법도 소수이며, 시험용액을 각기 조제하는 데에도 번거롭다. 또한, 추출, 정제 과정 중에 글라이코세이트의 손실이 있을 수도 있으므로 정확한 정량이 어렵다. 특히 상수원 및 하천, 약수 등으로 이용되는 수질 자원에 존재하는 글라이코세이트의 분석이 중요한데, 기존의 검출방법은 주로 기기분석에 기대고 있기 때문에, 현장 분석이 거의 불가능하며, 분석 비용이 비싼 단점이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Zhao, W., Brook, M.A., Li, Y., 2008a. ChemBioChem 9, 2363-2371

(비특허문헌 0002) Y. S. Kim, et al., A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline, Biosensors and Bioelectronics, Volume 26, Issue 4, 15 2010

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 제초농약의 한 종류인 글라이포세이트에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 개발하였다. 또한, 상기 글라이포세이트에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 금 나노입자 기반 색도 분석기법에 관한 조성물을 제조하여 잔류 농약을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서, 본 발명은 글라이포세이트(Glyphosate)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 DNA 앵타머를 이용한 검출방법 및 상기 DNA 앵타머를 포함하는 검출용 조성물을 제공하는데 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 제초농약의 한 종류인 글라이포세이트에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 개발하였다. 또한, 상기 글라이포세이트에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 금 나노입자 기반 색도 분석기법에 관한 조성물을 제조하여 잔류 농약을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 따라서, 본 발명은 글라이포세이트(Glyphosate)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 DNA 앵타머를 이용한 검출방법 및 상기 DNA 앵타머를 포함하는 검출용 조성물을 제공하는데 다른 목적이 있다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면 글라이포세이트에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하여 토양, 물 또는 식품 등에 존재하는 극미량의 잔류 농약을 보다 민감하게 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 항생물질 제거방법 및 장치에 이용하여 극소량의 항생물질이 포함되어 있는 시료에서 타겟물질만을 선택적으로 제거할 수 있다. 따라서, 식품 또는 환경에 존재하는 극소량의 잔류 농약으로 인한 생물농축현상 등으로부터 인간을 보호하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 앵타머를 이용한 금 나노입자 기반의 색도 분석법을 나타낸 것이다.
- 도 2는 글라이포세이트에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머 제조를 위한 DNA 풀 모식도이다.
- 도 3은 각 선별 단계(selection round)에서부터 얻어진 글라이포세이트에 결합하는 ssDNA 의 양이 증가함을 보여주는 그래프이다
- 도 4 내지 도 29는 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 26의 글라이포세이트에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 30은 DNA 앵타머 G15를 이용한 다양한 검출시료의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 31은 DNA 앵타머 G15를 이용한 다양한 글라이포세이트 농도의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 글라이포세이트(Glyphosate)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 글라이포세이트(Glyphosate)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 제공한다. 본 발명에서는 상기 글라이포세이트(Glyphosate)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 Flu-Mag SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다. 본 발명에 사용된 Flu-Mag SELEX 프로세스는 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법(Louis C. Bock, Linda C. Griffin, John A. Latham, Eric H. Vermaas, John J. Toole. 1992. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. Nature 355, 564-566)을 말한다.
- [0019] 본 발명의 DNA 앵타머에서, 상기 DNA 앵타머는 상기 SELEX 프로세스에 의해 선택된 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 어떠한 염기서열의 DNA 앵타머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 26 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 글라이포세이트(Glyphosate)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조방법을 제공한다:
- [0021] a) 글라이포세이트와 자성비드(magnetic beads)를 붕산염(borate) 버퍼 용액에서 반응시켜 공유결합을 유도하는 단계;
- [0022] b) 양 끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 기를 가지는 DNA pool과 상기 공유결합으로 얻은 글라이포세이트-자성비드를 버퍼용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;
- [0023] c) 상기 글라이포세이트-자성비드에 결합된 DNA를 자석을 이용하여 분리하는 단계;
- [0024] d) 상기 분리된 글라이포세이트-자성비드로부터 DNA를 분리시키는 단계; 및
- [0025] e) 상기 PCR용 프라이머 영역에 상보적인 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하여 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 DNA를 증폭시키는 단계.
- [0026] 본 발명의 방법에서, 상기 a) 단계의 공유결합은 글라이포세이트의 카복실기(carboxyl group)와 자성비드의 아민기(amine group)의 공유결합인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명의 방법에서, 상기 a) 단계 후, 공유결합된 글라이포세이트-자성 비드에서 글라이포세이트와 결합하지 않은 자성비드의 아민기를 하이드록실아민(hydroxyl amine) 용액으로 20 내지 30 °C에서 0.5 내지 1.5시간 동안 불활성화 시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명의 방법에서, 상기 d) 단계에서 DNA의 분리는 70 내지 90 °C에 3 내지 10분간 두어 DNA를 글라이포세이트-자성비드로부터 분리하는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 방법에서, 상기 e) 단계에서 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 기 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 글라이포세이트에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 글라이포세이트 검출용 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 조성물에서, 상기 DNA 앵타머는 서열번호 1 내지 26의 앵타머인 것을 특징으로 한다.
- [0032] 본 명세서에서 언급된 "Flu-Mag SELEX 프로세스"란 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법을 말한다.
- [0033] 본 발명의 앵타머는 또한 이 기술분야에서의 자체 공지 방법에 의해 화학 합성할 수 있다.

- [0034] 본 발명의 앵타머는, 글라이포세이트에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오타이드의 당 잔기(예, 리보오스나 디옥시리보스)가 수식된 것이어도 좋다. 당잔기에서 수식되는 부위로서는, 예컨대 당잔기의 2'부위, 3'부위 및/또는 4'부위의 산소원자를 다른 원자로 치환한 것 등을 들 수 있다. 수식의 종류로서는, 예컨대 플루오로화, 0-알킬화(예, 0-메틸화, 0-에틸화), 0-알릴화, S-알킬화(예, S-메틸화, S-에틸화), S-알릴화, 아미노화(예, -NH)를 들 수 있다. 이러한 당잔기의 변형은, 자체 공지의 방법에 의해 행할 수 있다(예컨대 Sproat *et al.*, (1991) *Nucle. Acid. Res.* 19, 733-738; Cotton *et al.*, (1991) *Nucl. Acid. Res.* 19, 2629-2635; Hobbs *et al.*, (1973) *Biochemistry* 12, 5138-5145 참조).
- [0035] 본 발명의 앵타머는 또한 글라이포세이트에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 변형(예, 화학적 치환)된 것이어도 좋다. 이러한 변형으로서는, 예컨대 5부위 피리미딘 변형, 6 및/또는 8부위 푸린 변형, 환외(環外) 아민에서의 변형, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모 또는 5-요오드-우리실으로의 치환을 들 수 있다.
- [0036] 또한, 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성을 갖도록, 본 발명의 앵타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대 P(0)0기가, P(0)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(0)NR₂(아미데이트), P(0)R, R(0)OR', CO 또는 CH₂(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH₂-CH₂-)으로 치환되어 있어도 좋다 [여기서 각각의 R 또는 R'은 독립적으로, H이거나, 또는 치환되어 있거나, 또는 치환되어 있지 않은 알킬(예, 메틸, 에틸)이다]. 연결기로서는, -O-, -N- 또는 -S-가 예시되고, 이들의 연결기를 통하여 인접하는 뉴클레오타이드에 결합할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.
- [0038] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일(Myristoyl), 리쵸콜릭-올레일(Lithocolic-oleyl), 도코사닐(Docosanyl), 라우로일(Lauroyl), 스테아로일(Stearoyl), 팔미토일(Palmitoyl), 올레오일(Oleoyl), 리놀레오일(Linoleoyl), 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 향암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 변형에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.
- [0039] 본 발명은 또한, 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 글라이포세이트 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명의 글라이포세이트 조성물은 잔류 허용기준을 초과하는 농약, 제초제 중에서 가장 많이 검출되는 제초제인 글라이포세이트(Glyphosate)를 검출하기 위한 것으로, 잔류 농약은 매우 적은 양으로 식품이나 환경에 존재 하더라도 생물농축 현상 등과 같은 여러 환경적인 경로에 의해서 최종 소비자인 사람에게 영향을 미칠 수 있기 때문에, 축수산물에서 광범위하게 사용되고 있는 잔류 농약을 검출 및 제거하는 기술이 필요하다. 따라서, 글라이포세이트의 검출을 위해 본 발명의 DNA 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 DNA 앵타머를 자성비드에 고정화시켜 글라이포세이트를 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-글라이포세이트 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 글라이포세이트를 분리함으로써 글라이포세이트만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다. 또한, 본 발명의 DNA 앵타머-자성비드를 본 발명의 실시예에 기술된 방법 이외에도 본 발명의 DNA 앵타머와 연결자로 연결된 센서를 이용하여 시료 중의 글라이포세이트를 검출하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물을 이용하는 글라이포세이트의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 DNA 앵타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 글라이포세이트를 포함하는 시료를 통과시켜 글라이포세이트만을 선택적으로 제거할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 또한, 상기 DNA 앵타머를 이용한 글라이포세이트의 검출방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명에서는 금 나노입자 기반의 색도 분석으로 글라이포세이트를 검출할 수 있다. 즉, 금 나노입자 표면을 변형하여 앵타머를 금 나노입자 표면에 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 두 개 이상의 금 나노입자 거리가 서로 가까워짐으로 인해 응집(aggregation)이 일어나서 금 나노입자 용액의 색이 붉은색에서 푸른색 계열로 변하는 특징을 이용하거나, 변형되지 않은 금 나노입자 표면에 앵타머가 물리적으로 흡착되어 있다가 타겟 물질이 있을 때 흡착되어 있던 앵타머와 타겟과의 결합으로 인해 금 나노입자의 표면에서 떨어져 나오는 현상에 의해 색이 변하는 특징을 이용하여 글라이포세이트를 검출할 수 있다.

- [0043] 본 발명은 또 다른 관점에서 압타머를 이용한 글라이포세이트의 검출방법에 관한 것이다. 상기 글라이포세이트는 물, 토양, 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.
- [0044] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 서열번호 1 내지 26으로 표시되는 핵산 앵타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 11로 표시되는 핵산서열인 앵타머 G15에 대하여 금 나노입자 기반 색도 분석을 수행한 결과, 글라이포세이트 특이적으로 결합함을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 상기 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 글라이포세이트의 검출센서에 관한 것이다.
- [0045] 상기 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 검출 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 글라이포세이트 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.
- [0046] 본 발명에 따른 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 글라이포세이트만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 글라이포세이트의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.
- [0047] 본 발명은 또 다른 관점에서, 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 글라이포세이트의 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 글라이포세이트가 포함된 시료를 통과시켜 글라이포세이트를 제거할 수 있다.
- [0048] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0049] **실시예1: 자성비드에 글라이포세이트(Glyphosate) 결합**
- [0050] 글라이포세이트(Glyphosate, Sigma Co.)의 카복실기(carboxyl group)와 자성비드(M-270 Amine activated magnetic beads, Dynal Biotech ASA, Norway)의 아민기(amine group)는 공유결합을 형성하게 되는데, 이것을 위해 5.91 mM의 글라이포세이트와 0.2×10^9 개의 자성비드를 버퍼용액(0.1 M MES buffer, pH 4.7)에 넣고 RT에서 2시간 반응시켰다. 글라이포세이트가 결합된 자성비드(글라이포세이트-자성비드)는 자석을 이용해서 분리가 가능하며 같은 버퍼용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않은 글라이포세이트를 제거하였다. 글라이포세이트가 결합된 자성비드는 세척 후 10mM의 하이드록실아민(hydroxyl amine) 과 RT에서 1시간 반응시켜 글라이포세이트와 결합하지 않은 아민기를 불활성시켰다. 활성을 가지고 있는 아민기가 남아있으면 분자간의 여러 가지 상호작용, 예컨대, 반데르발스 결합, 소수성 상호작용(hydrophobic interaction) 등으로 인해 비특이적 결합(nonspecific binding)이 일어날 수 있기 때문에 활성이 거의 없다고 알려진 하이드록실아민 용액으로 활성기를 차단(blocking)시켰다. 수차례 세척 후 버퍼용액(0.1 M borate, pH 9.5)에 자성 비드를 혼합하여 4 °C에서 보관하였다.
- [0051] **실시예 2: 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성**
- [0052] 76mer DNA pool로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역(primer region)이 있고 중앙에 40개의 임의의 염기를 가진 DNA pool을 아래와 같은 방법으로 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA pool은 Genotech Inc. Korea에 화학적으로 합성을 의뢰하였다.

[0053] CGTACGGAATTCGCTAGC-N40-GGATCCGAGCTCCACGTG

[0054] 서열번호 27: CGTACGGAATTCGCTAGC

[0055] 서열번호 28: GGATCCGAGCTCCACGTG

[0056] **실시예 3: 글라이포세이트와 결합하는 DNA 앵타머의 선별**

[0057] 상기 실시예 2에서 합성된 랜덤 DNA pool을 글라이포세이트가 고정되어 있는 자성 비드와 함께 버퍼용액(20mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂ 및 0.02% Tween 20)에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후 글라이포세이트와 결합하지 않은 DNA를 제거하기 위해 위의 혼합액이 들어 있는 튜브를 자석에 고정시켜서 글라이포세이트와 결합하지 않은 DNA를 제거하고, 결합력이 약한 DNA를 제거하기 위해 버퍼용액으로 10회 세척하였다. 글라이포세이트와 결합한 DNA를 용리하기 위해서는 튜브를 80℃에서 10분간 두어 DNA를 자성비드에서부터 분리시킨 다음 에탄올 침전법으로 용리된 DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 글라이포세이트에 결합하는 DNA의 양을 측정하였다. 도 3에서는 각 선별단계(selection round)에서 얻어진 글라이포세이트에 결합하는 DNA의 양이 증가하고 있음을 보여주었다.

[0058] **실시예 4: 글라이포세이트와 결합 가능한 DNA 앵타머 pool의 제조**

[0059] 글라이포세이트 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0060] PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0061] forward (APTFf) 5' -fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC: 서열번호 29

[0062] reverse (APTR) 5' -CACGTGGAGCTCGGATCC-3' : 서열번호 30

[0063] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중가닥의 DNA를 단일 가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 실시하였다. 10%의 폴리아크릴아마이드 젤에는 6M의 요소(urea), 20%의 포름아마이드(formamide)가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 플루오레세인이 붙어 있는 DNA 밴드를 잘라내어 젤 추출(gel extraction)을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 글라이포세이트가 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 글라이포세이트와 반응시켰다. 이러한 과정의 모식도를 도 2에 나타내었고, 일련의 과정(FluMag-SELEX process)을 한 번의 선별(selection)이라 하면 총 6번의 선별과정을 거쳐 최종적으로 60% 이상이 글라이포세이트에 결합하는 DNA pool을 얻었다. 3번째 선별 후에는 각각 AMPA와 글라이포세이트로 count selection을 실시함으로써 비특이적으로 결합하는 DNA를 차단하고 글라이포세이트에만 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA pool을 확보하였다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Quiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과, 서로 다른 26종의 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 확보하였다.

[0064] **실시예 5: 26 종의 DNA 앵타머의 염기서열 분석 및 특이성 분석**

[0065] 서로 다른 26 종의 글라이포세이트에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1에 제시하였다. 또한, 이 26 종의 글라이포세이트 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 4-도 29에 나타내었다.

표 1

[0066]

글라이포세이트에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 26종의 DNA 앵타머의 염기서열

서열번호	앵타머	염기서열 (5'-3')
1	G1	CGTACGGAATTCGCTAGCGCCATCCTGTTGGTGTGGTATGTGTGTTGTGCCCTCGGATCCGAGCTCCACGTG
2	G2	CGTACGGAATTCGCTAGCACATGACAACATACCGGTGGAACGTCGCACATCCGCACCAGGATCCGAGCTCCACG TG
3	G3	CGTACGGAATTCGCTAGCGGTGGTGGGGGCTATCCGAGGAGGGTGGTCTGGCGGTTGTGGATCCGAGCTCCACG TG
4	G4	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGCATACATGTGCTACCTACGCCTACTGATTATAGACTCGGATCCGAGCTCCACG TG
5	G8	CGTACGGAATTCGCTAGCAGGGGCTCTGGGTGGGATGTATGCAGATGGGGACAGTACCGGATCCGAGCTCCACG TG
6	G9	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAACAATAACAACCGACCGACTGAACGCCACCCGAGTAGGATCCGAGCTCCACG TG
7	G11	CGTACGGAATTCGCTAGCAGGGGTCTGGGTGGGATGTATGCAGATGGGGACAGTACCGGATCCGAGCTCCACG TG
8	G12	CGTACGGAATTCGCTAGCAGTGTACACAGACCAACCATCGCCAAATGTCAGACCTCGGATCCGAGCTCCACG TG
9	G13	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGAAGGGGGGTATACAGTGTGGGTAGTCATGGGCGGGATCCGAGCTCCACGTG
10	G14	CGTACGGAATTCGCTAGCAGGAGTTGGGTATGGGTGGGATATCCTCATACGAGGCTGGGATCCGAGCTCCACGT G
11	G15	CGTACGGAATTCGCTAGCAGAGGGATGGTGTGGGTGGCTGCGGCTATAGGAGCGTACCGGATCCGAGCTCCACG TG
12	G16	CGTACGGAATTCGCTAGCTAGGCTCGTCGGGTGGTGGGGGGGACTGTGGGTAGTTAGGATCCGAGCTCCACGT G
13	G18	CGTACGGAATTCGCTAGCAACATCCACCATATACACTACACCTTGCGCCATATACAGGATCCGAGCTCCACG TG
14	G19	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGGTTGGGTGGGATGGCTGTGGTGTGTATAGTAATGGATCCGAGCTCCACG TG
15	G20	CGTACGGAATTCGCTAGCATATGGAGGGCGGGCTGGGCTATGACGAAGCGCAGAATGGGATCCGAGCTCCACG TG
16	G21	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGTAGTATGAAGGTGGGTGGTGGGTAGAGTCTGTCTGGGATCCGAGCTCCACG TG
17	G22	CGTACGGAATTCGCTAGCAACACCATATCCCATGCCCGCTCCATGTGCTCTCTATCCGATCCGAGCTCCACG TG
18	G23	CGTACGGAATTCGCTAGCCATAGTGCAGGGGTAGGGGTGGGGGGGTGCCGAGTACAGGATCCGAGCTCCACG TG
19	G25	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTGGGTGGTGGGGGGGTGTGATGGTAGAACGAGATGCTAGGATCCGAGCTCCACG TG
20	G27	CGTACGGAATTCGCTAGCCAGCAATGCATGCAGACAAGACCGTCCCAGACCGTCCCAGGATCCGAGCTCCACG TG
21	G28	CGTACGGAATTCGCTAGCCGTGGTCGACGGGAGGGGAGGTGGGTGGTGGTATGAGTGGGATCCGAGCTCCACG TG
22	G29	CGTACGGAATTCGCTAGCTCGAGGTGGGTGGGGGGGTATGTGGTGCAGCCAAGCAACGGATCCGAGCTCCACG TG
23	G30	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTCGCTTACTCTCTGTGGAGTCTCTGGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
24	G32	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGTGGGGCGGGGTGGGTGGAAAAGTAACGTGCAGTTAGGATCCGAGCTCCACG TG
25	G33	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTGGGTGGAGGGGCCGGGATGGATGGTGATACGTAATGGGATCCGAGCTCCACG TG
26	G34	CGTACGGAATTCGCTAGCATCGTACGCACACACATGGCATAATCATACATACAACCGGATCCGAGCTCCACG TG

[0067]

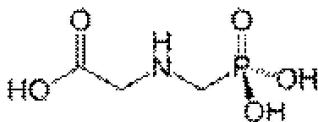
상기 26종의 DNA 앵타머 중에서 글라이포세이트에 대한 특이성이 가장 높은 1종의 앵타머를 다음과 같이 선택하였다.

[0068]

2 nM의 금 나노입자와 200 nM의 각각의 글라이포세이트 결합 앵타머를 3차 증류수에 넣고 상온에서 30분간 흡착 반응시킨 후 250 μ M의 글라이포세이트[화학식 1]와 AMPA[화학식 2], 글루포시네이트(Glufosinate)[화학식 3]를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 상기 용액에 0.2M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후

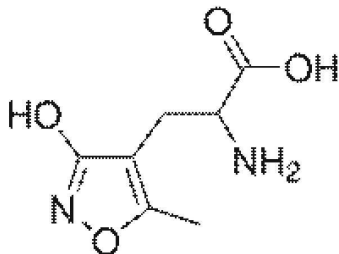
금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정 앵타머와 글라이포세이트와의 결합력이 가장 높은 앵타머 G15를 선정하였다. UV 흡광도 그래프와 반응 후의 샘플의 사진을 도 30에 제시하였다.

[0069] [화학식 1]



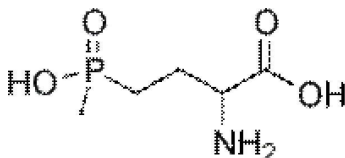
[0070]

[0071] [화학식 2]



[0072]

[0073] [화학식 3]



[0074]

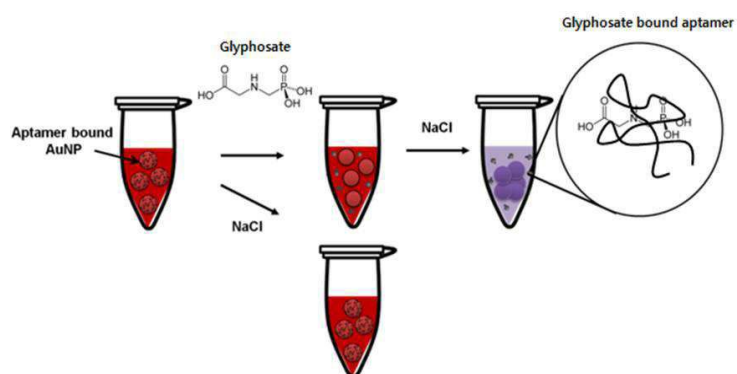
[0075] 실시예 6: 1종의 DNA 앵타머의 글라이포세이트와의 결합력 분석

[0076] 서로 다른 26 종의 글라이포세이트에 특이적으로 결합하는 앵타머 중에서 가장 특이도가 높은 1개의 앵타머인 G15와 다양한 농도의 글라이포세이트와의 결합을 분석하였다.

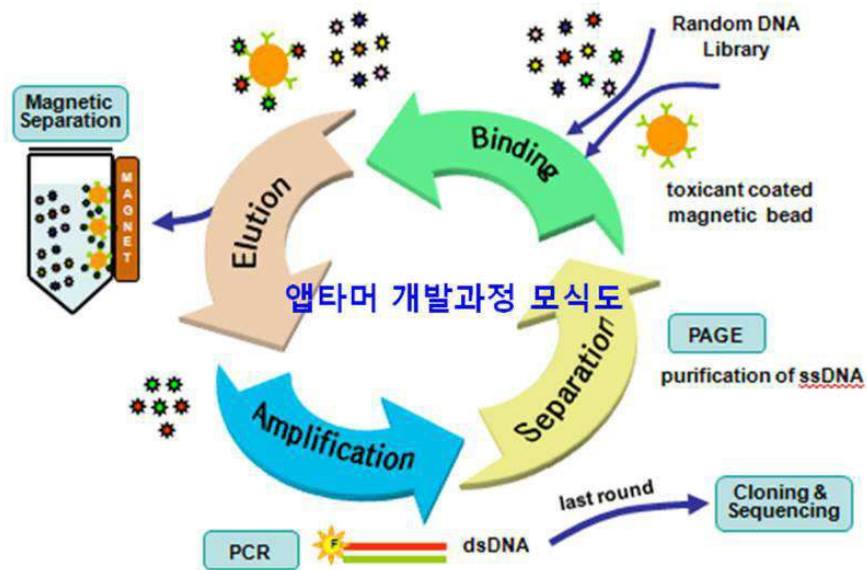
[0077] 2nM의 금 나노입자와 200nM의 각각의 글라이포세이트 앵타머를 3차 증류수에 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 0에서 591 uM의 글라이포세이트를 첨가하여 30분간 반응시킨다. 상기 용액에 0.2M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도하여 금 나노 입자의 UV 흡광도를 측정하였다. UV 흡광도 그래프와 반응 후의 샘플의 사진을 도 31에 제시하였다. 이로 보아 글라이포세이트 결합 특이적인 앵타머와 금 나노입자를 이용하여 글라이포세이트를 검출할 수 있는 것을 증명하였다.

도면

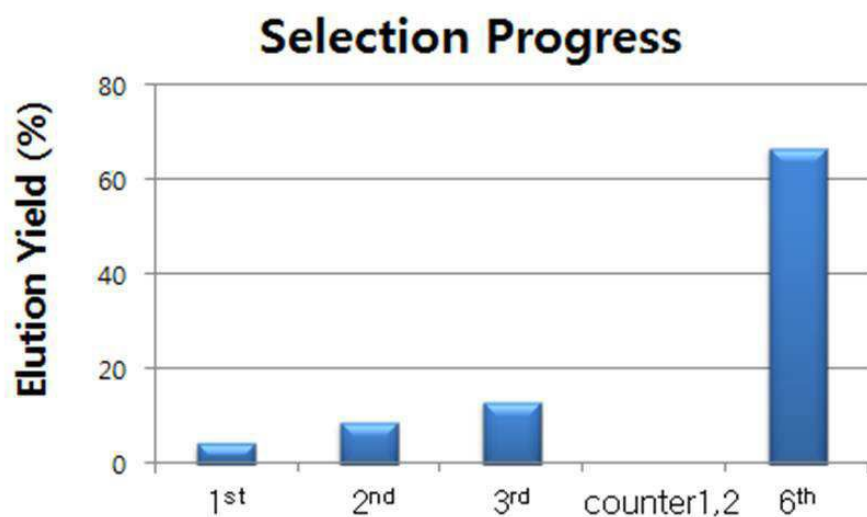
도면1



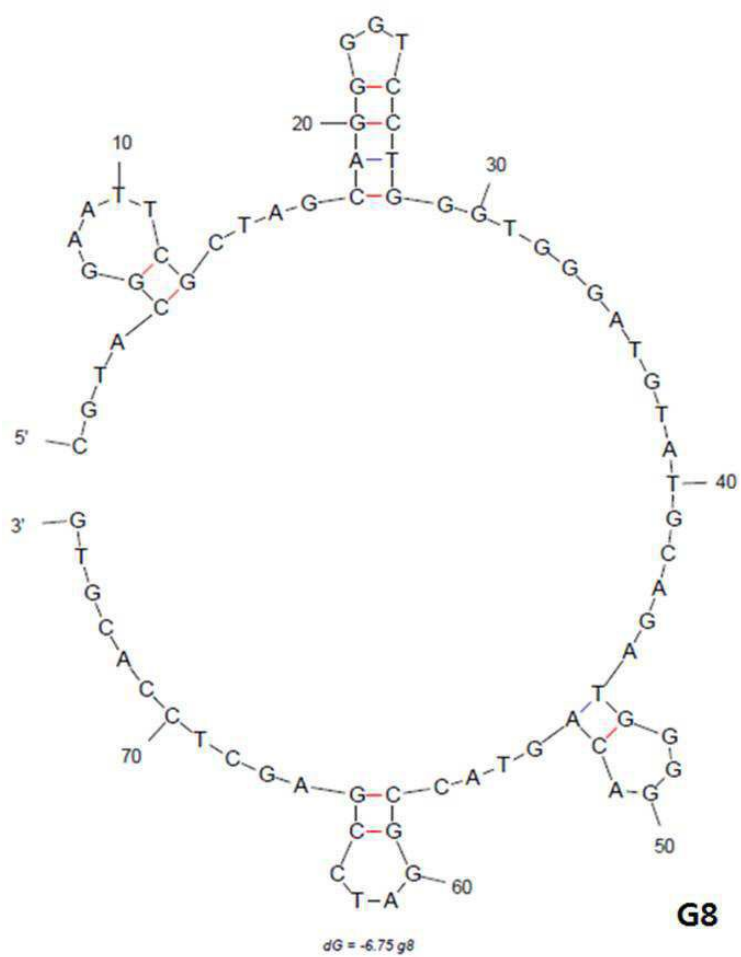
도면2



도면3

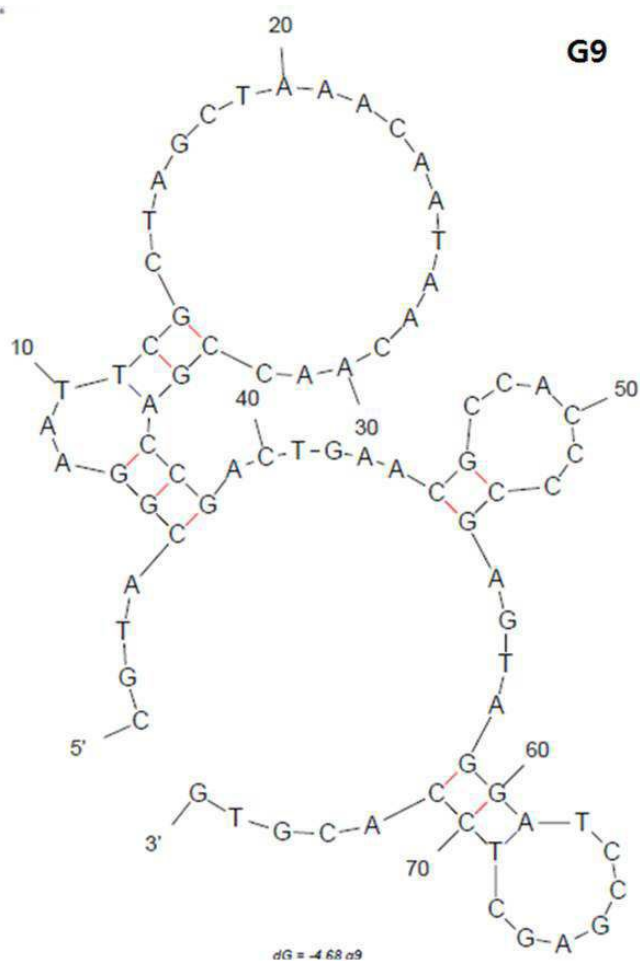


도면8

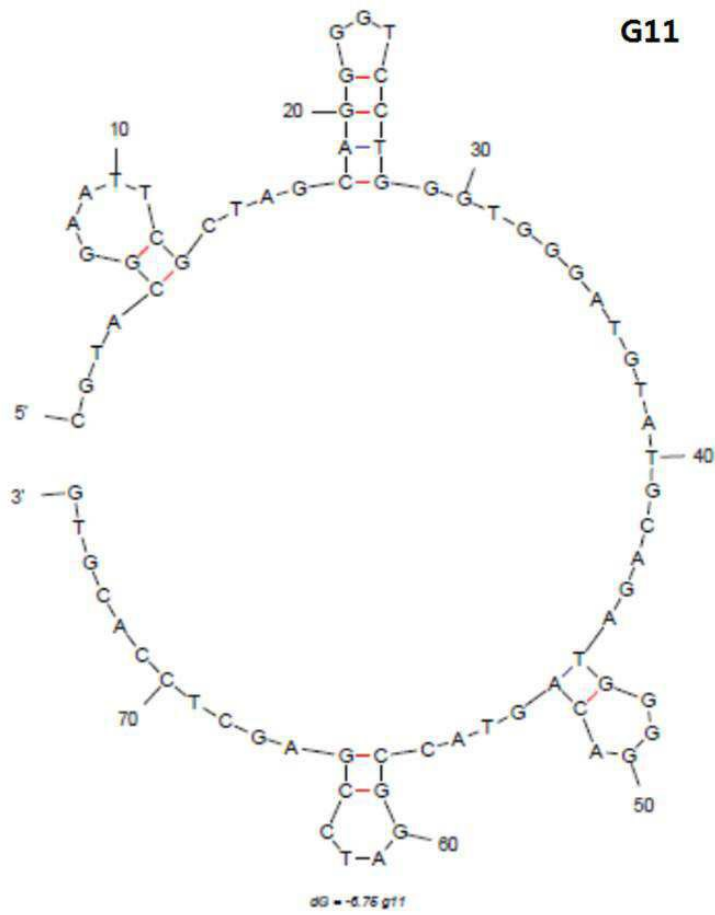


도면9

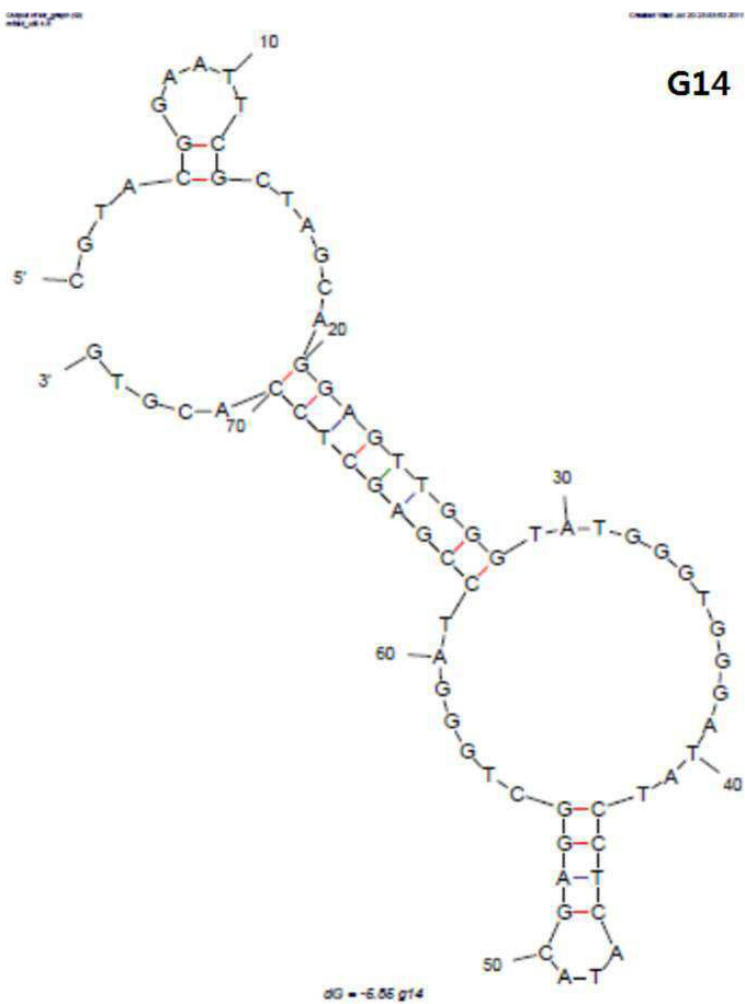
FIG. 9



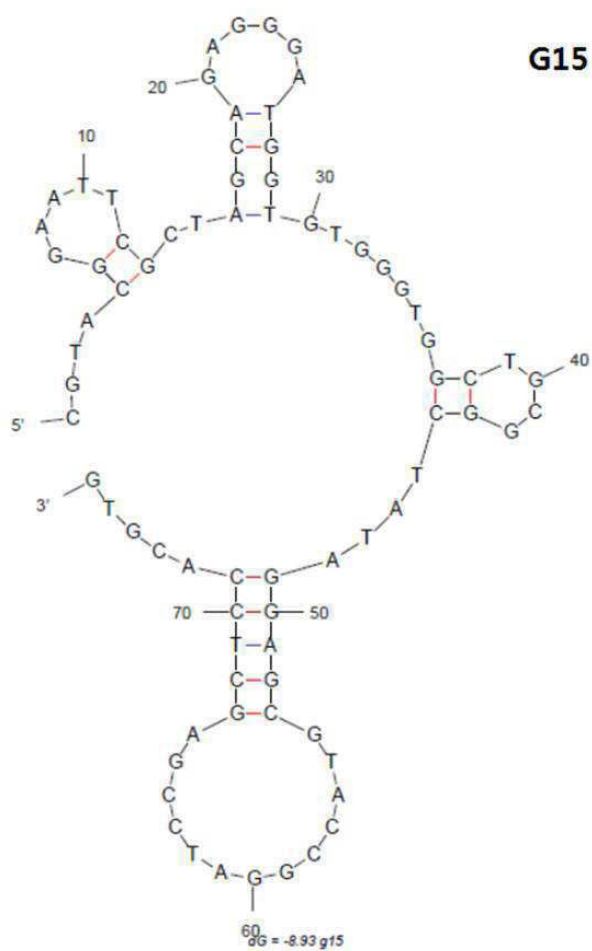
도면10



도면13

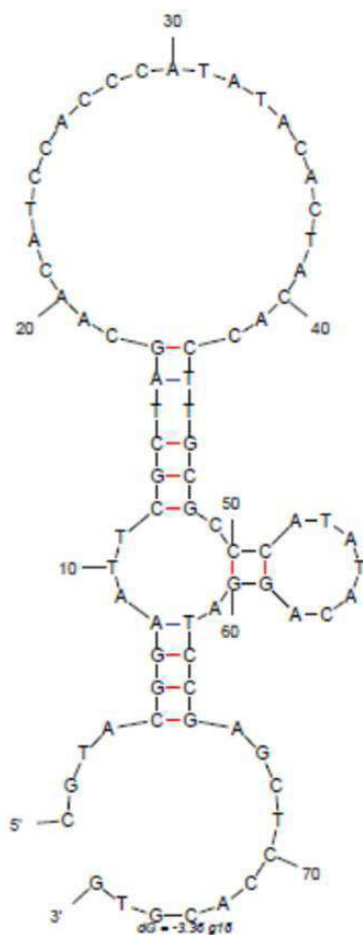


도면14



도면16

Chemical structure (G18)



Chemical structure (G18)

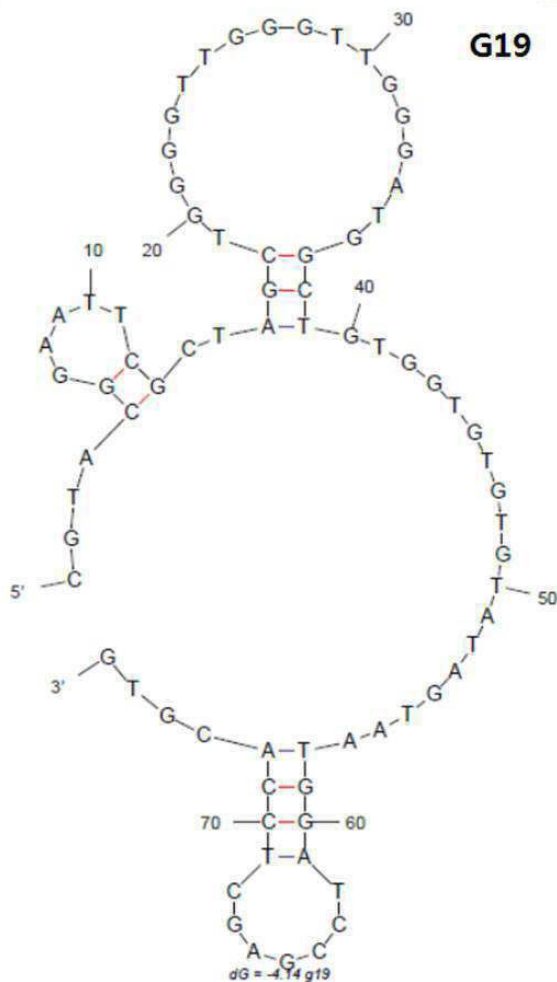
G18

도면17

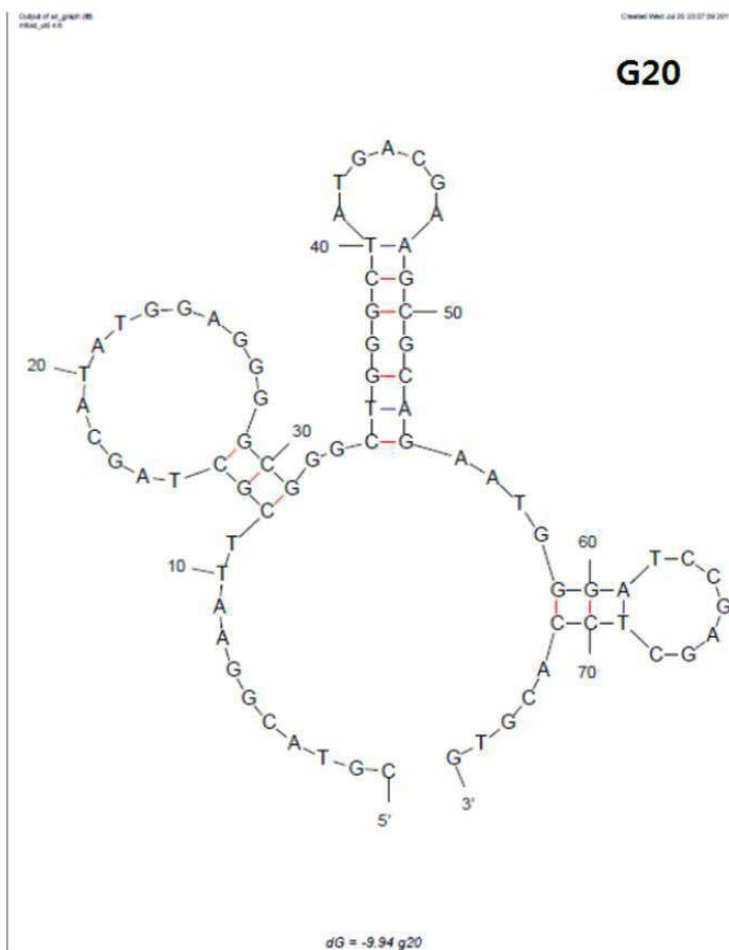
Output of mcs_graph (88)
mcsat_v0.0.0

Created Wed Jul 20 23:50:28 2011

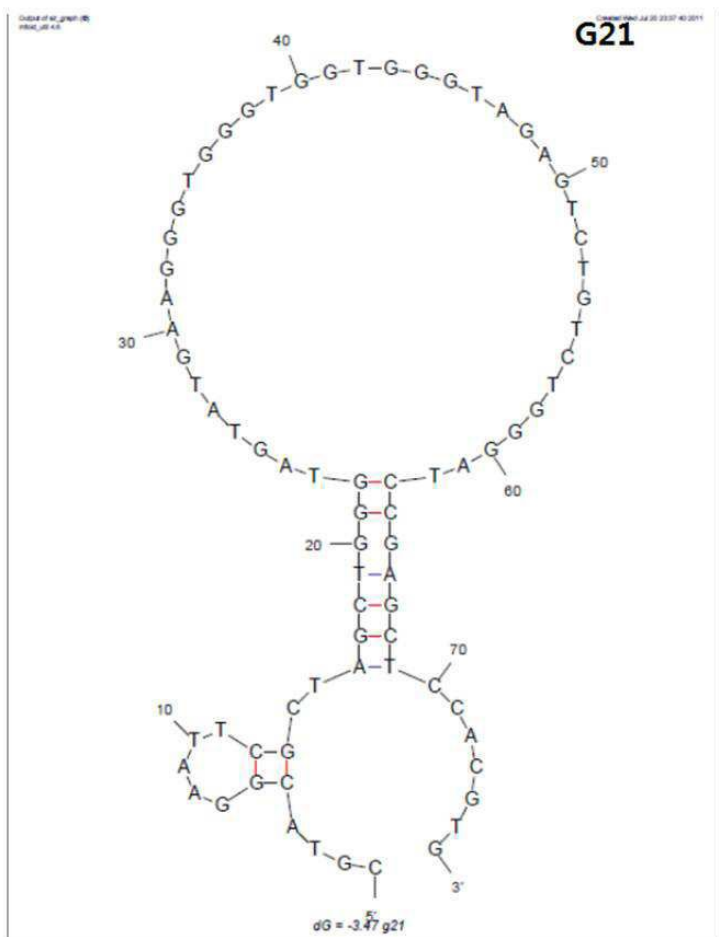
G19



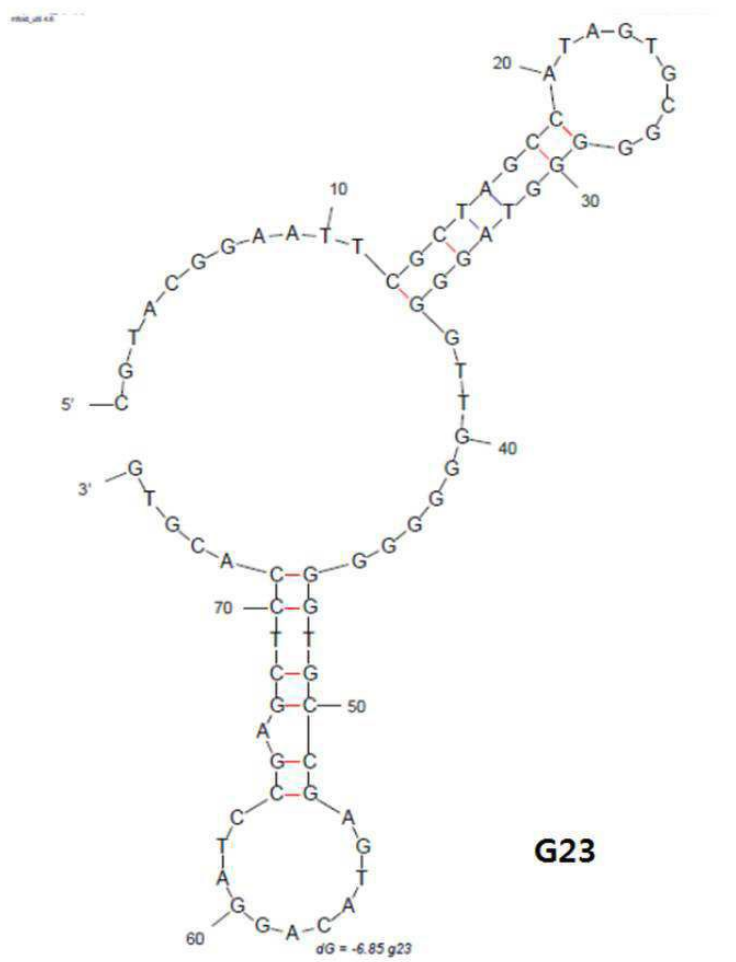
도면18



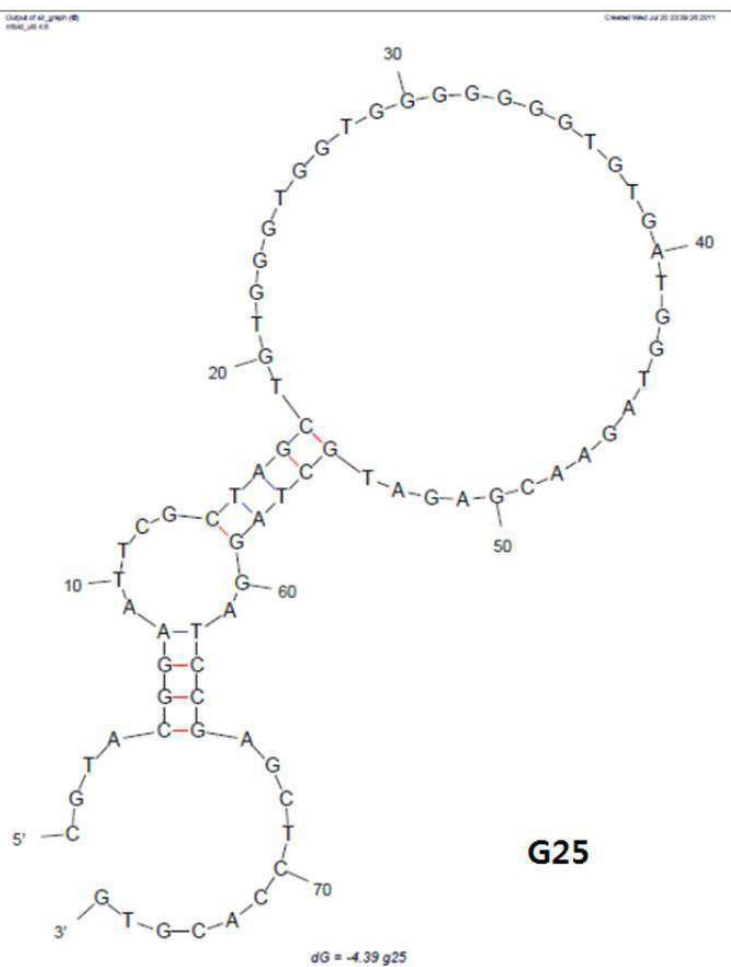
도면19



도면21



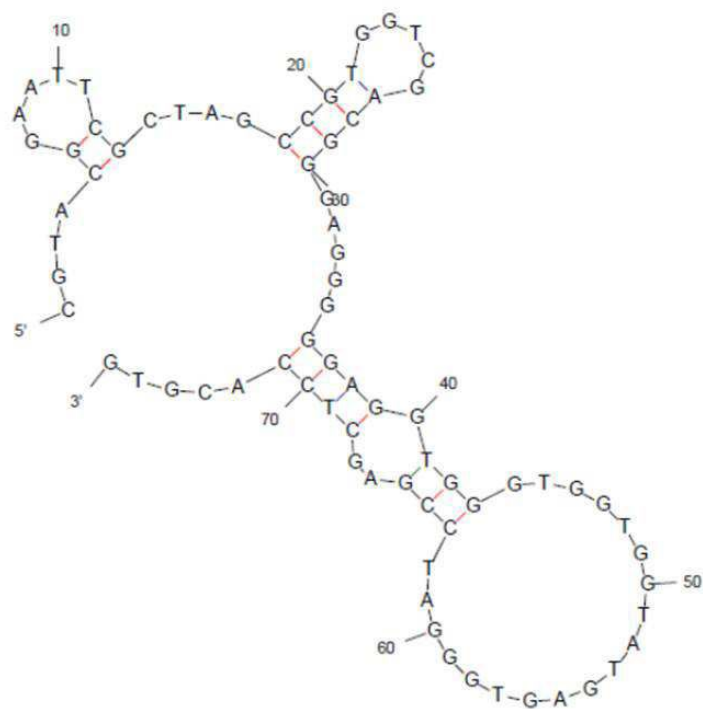
도면22



도면24

Output of Mfold 3.6
mfold_3.6

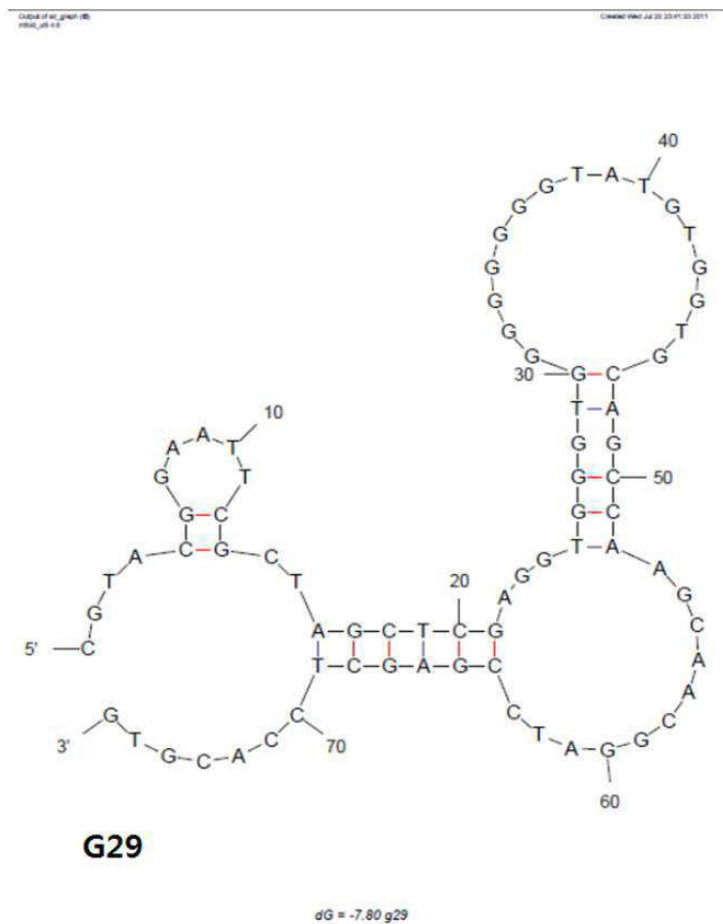
ClustalW 1.9.4.2 (20 23-01-2011)



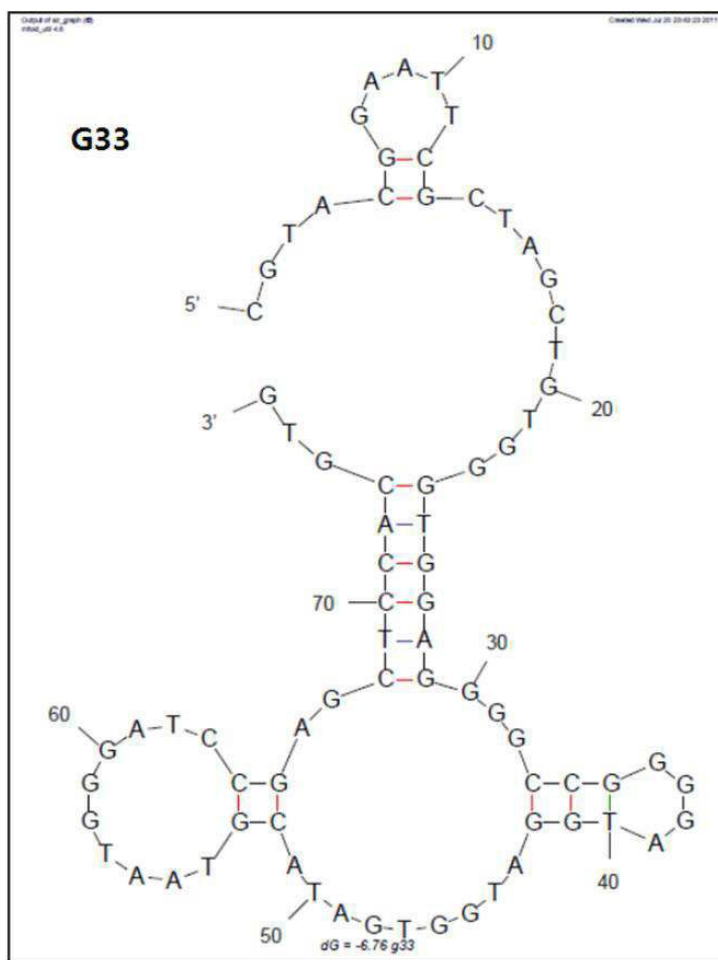
G28

$\Delta G = -8.72$ g28

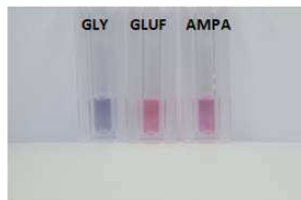
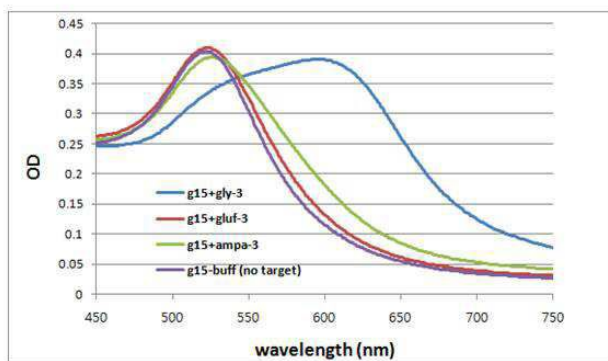
도면25



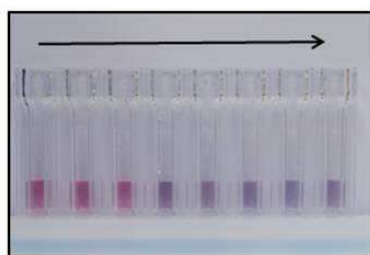
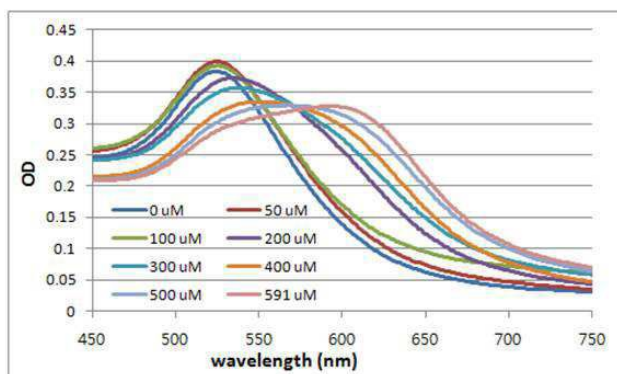
도면28



도면30



도면31



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> DNA aptamer binding to Glyphosate with specificity
 <160> 30
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G1
 <400> 1
 cgtacggaat tcgctagcgc ccatactgtt ggtgtggtat gtgtgttgtg ccctcggatc 60
 cgagctccac gtg 73
 <210> 2
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <
 220><223> DNA aptamer G2
 <400> 2
 cgtacggaat tcgctagcac atgacaacat accggtcgaa cgtcgacat ccgcaccagg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 3
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G3
 <400> 3
 cgtacggaat tcgctagcgg tgggtggggc tatccgagga ggggtggtctg gcggttgtgg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 4
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G4
 <400> 4

cgtacggaat tcgctagctg gcatacatgt gctacctacg cctactgatt atagactcgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 5	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G8	
<400> 5	
cgtacggaat tcgctagcag gggtcctggg tgggatgtat gcagatgggg acagtaccgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210>	
6	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G9	
<400> 6	
cgtacggaat tcgctagcta aacaataaca accgaccgac tgaacgccac cccgagtagg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 7	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G11	
<400> 7	
cgtacggaat tcgctagcag gggtcctggg tgggatgtat gcagatgggg acagtaccgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 8	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G12	
<400> 8	
cgtacggaat tcgctagcag tgtacacaga ccaaaccatc gcccaaatgt cagacctcgg	60

atccgagctc cacgtg	76
<210> 9	
<211> 74	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G13	
<400> 9	
cgtacggaat tcgctagctg cgaagggggg gtatacagtg tgggtagtca tgggcgggat	60
ccgagctcca cgtg	74
<210> 10	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G14	
<400> 10	
cgtacggaat tcgctagcag gagtgggta tgggtgggat atcctcatac gaggtggga	60
tccgagctcc acgtg	75
<210> 11	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G15	
<400> 11	
cgtacggaat tcgctagcag agggatggtg tgggtggctg cggctatagg agcgtaccgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 12	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DNA aptamer G16	
<400> 12	
cgtacggaat tcgctagcta ggctcgtcgg gtgggtggggg gggactgtgg gtagttagga	60
tccgagctcc acgtg	75

<210> 13
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G18
 <400> 13
 cgtacggaat tcgctagcaa catccaccca tatacactac accttgcgcc catatacagg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 14
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G19
 <400> 14
 cgtacggaat tcgctagctg gggttgggtt gggatggctg tgggtgtgtg atagtaatgg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 15
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G20
 <400> 15
 cgtacggaat tcgctagcat atggaggggc gggctgggct atgacgaagc gcagaatggg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 16
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G21
 <400> 16
 cgtacggaat tcgctagctg ggtagtatga agggctgggtg gtgggtagag tctgtctggg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 17

<211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G22
 <400> 17
 cgtacggaat tcgctagcaa caccatatcc catgcccgcc tccatgtgct ctctatccgg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 18
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G23
 <400> 18
 cgtacggaat tcgctagcca tagtgccggg gtaggggttg ggggggtgc cgagtacagg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 19
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G25
 <400> 19
 cgtacggaat tcgctagctg tgggtggtgg gggggtgtga tggtagaacg agatgctagg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 20
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G27
 <400> 20
 cgtacggaat tcgctagcca gcaatgcatg cagacaagac cgtcccagac cgtgcccagg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 21
 <211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA aptamer G28

<400> 21

cgtacggaat tcgctagccg tggctgcacgg gagggggagg tgggtggtgg tatgagtggg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 22

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA aptamer G29

<400> 22

cgtacggaat tcgctagctc gaggtgggtg gggggggtat gtggtgcagc caagcaacgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 23

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA aptamer G30

<400> 23

cgtacggaat tcgctagctg tcgcttactc tctgtggagt ctctgggtgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 24

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA aptamer G32

<400> 24

cgtacggaat tcgctagctg gtgggggcgg ggtgggtgg aaaagtaacg tgcagttagg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 25

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G33
 <400> 25
 cgtacggaat tcgctagctg tgggtggagg ggccggggat ggatggtgat acgtaatggg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 26
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer G34
 <400> 26
 cgtacggaat tcgctagcat cgtacgcaca cacatggcat aatcatacac atacaaccgg 60
 atccgagctc cacgtg 76

<210> 27
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 cgtacggaat tcgctagc 18

<210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>

> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 ggatccgagc tccacgtg 18

<210> 29
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 29

cgtacggaat tcgctagc	18
<210> 30	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 30	
cacgtggagc tcggatcc	18