



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0038367
(43) 공개일자 2018년04월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0107733
(22) 출원일자 2017년08월25일
심사청구일자 2017년08월25일
- (30) 우선권주장
1020160129111 2016년10월06일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
구만복
서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 하
나과학관 603호 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
- 김원태
서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 하
나과학관 603호 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
- 이방현
서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 하
나과학관 603호 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
- (74) 대리인
이처영, 장제환

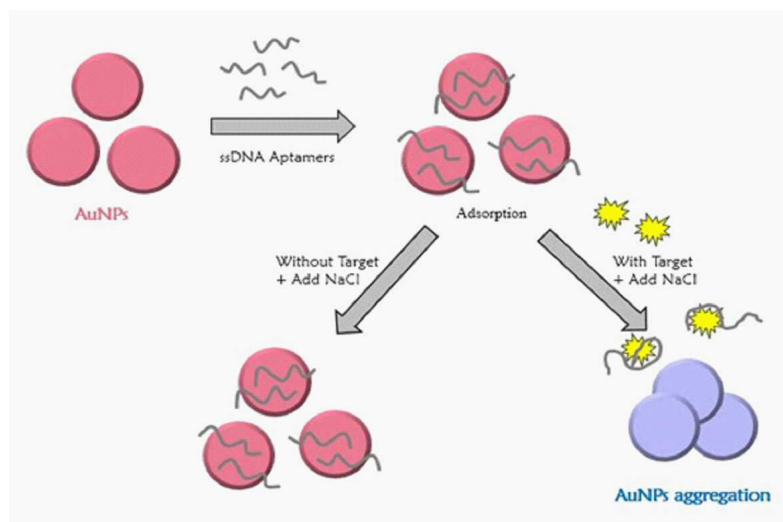
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 프로게스테론 (progesterone)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 프로게스테론 검출용 핵산 앵타머, 이를 포함하는 프로게스테론의 검출방법, 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트는 프로게스테론 앵타머의 프로게스테론에 대한 높은 특이성과 결합력을 바탕으로 시료 내 존재하는 프로게스테론의 검출에 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/743 (2013.01)

C12N 2310/16 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 11 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 프로게스테론 (progesterone)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머:

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

청구항 2

제1항의 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 프로게스테론 (progesterone)의 검출방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 프로게스테론 (progesterone)의 검출방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 검출은 금 나노입자 기반의 색도 분석 방식으로 검출하는 것을 특징으로 하는 프로게스테론 (progesterone)의 검출방법.

청구항 5

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 프로게스테론 (progesterone) 관련 질환의 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 프로게스테론 (progesterone) 관련 질환은 생리불순, 생리통, 부정출혈, 월경전증후군, 불임, 피부암, 여드름, 우울증, 노화 및 수면장애로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항의 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 고상 담체는 기관, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 및 다공재질인 고상 담체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 기관은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관, 유리 기관, 아파타이트 (apatite)

기관, 실리콘 기관, 금 기관, 은 기관 및 알루미늄 기관으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 10

제1항의 핵산 앵타머 또는 제7항의 복합체를 포함하는 프로게스테론 (progesterone) 검출용 조성물.

청구항 11

제1항의 핵산 앵타머 또는 제7항의 복합체를 포함하는 프로게스테론 (progesterone) 검출용 센서.

청구항 12

제1항의 핵산 앵타머 또는 제7항의 복합체를 포함하는 프로게스테론 (progesterone) 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프로게스테론 (progesterone)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로게스테론(progesterone)은 체내의 여러 곳에 작용해 생리작용에 영향을 미치는 물질이다. 난소의 황체에서 분비되며 특히 여성의 생식주기를 조절하는 역할을 하고, 자궁에 작용해 자궁벽의 두께를 두껍게 함으로써 수정란의 착상과 안정적인 임신에 도움을 주는 체내 대사 물질이다. 또한 에스트로겐(estrogen), 테스토스테론(testosterone) 등 스테로이드 호르몬들의 전구체 역할을 한다. 따라서 프로게스테론(progesterone)의 체내 농도를 일정하게 유지하는 것은 생식 주기에 관한 문제뿐만 아니라 유산, 자궁 외 임신, 자궁 내 태아사망 등의 임신 관련 문제와 두통, 발열, 우울증 등의 질병에서도 중요하다.

[0003] 기존의 프로게스테론(progesterone) 농도 검사는 항체를 이용하는 방식으로 항체의 가격이 비싸고, 검사 환경의 제약이 있어 불편함이 있었다. 따라서 경제적이고도 간단하게 체내 프로게스테론(progesterone)의 농도를 측정하는 방법 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 앵타머(aptamer)는 $10^{12\sim14}$ 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, 시험관내(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 체내 프로게스테론(progesterone) 농도 측정에 매우 적절한 물질이며, 이를 활용한 나노 바이오 기술을 통해 특정 체내 대사 물질을 검출하는데도 응용할 수 있다.

[0005] 앵타머 개발 방법에 있어서 가장 중요한 요소는 타겟물질에 결합한 DNA (혹은 RNA)와 결합하지 않은 DNA를 구별하는 것인데, 이를 위하여 타겟을 고정하거나 DNA 랜덤 라이브러리를 고정하여 DNA를 구별하는 방법이 시도되었다. 그러나 이러한 고정화 방식은 고정화 수율이 낮고 고정화 수율 자체를 분석하는데 많은 비용과 시간이 소모된다. 또한 고정화에 사용되는 분리용 물질 (자성 비드, 컬럼 등)에 DNA가 비특이적으로 결합할 가능성을 완전히 배제할 수 없으며 고정된 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리해내는 과정에서 DNA 풀의 손실이 일어날 수 있다는 것 등이 여전히 문제이다. 그 외에도 중금속 이온 등은 고정화 자체가 어려워 고정화 방식을 이용한 앵타머의

합성은 타겟 선정에도 제약이 있을 수 있다. 이에, 고정화 방식의 한계를 극복하는 비고정화 방식의 앵타머 개발 기술이 시도되었다. 그러나 비고정화 방식의 미세전자기계 시스템 (MEMS), 모세관 전기이동 시스템 (Capillary Electrophoresis) 기술은 고가의 장비, 장치 사용의 복잡성, 숙련된 인력의 필요성 등의 문제점이 나타났다. 한편, 그래핀은 2차원 구조의 탄소 구조체이므로 열안정성, 전기적 특성 및 강도가 매우 우수하며, 단일가닥 DNA의 염기 부분과 π -스태킹을 통해 결합하기 때문에 이런 특성을 응용한 광범위한 연구가 진행되고 있다.

[0006] 금 나노입자 기반의 색도진단법은 그 준비의 편리성과 간단한 작동법 그리고 육안으로 색 변화를 관찰할 수 있다는 점에서 최근 들어 on-site 탐지의 새로운 대안으로 떠오르고 있다[Zhao, W et al., 2008a. ChemBioChem 9, 23632371]. 이러한 금 나노입자 기반 앵타머 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 특성을 이용하는 것이다.

[0007] 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(Y. S. Kim et al., Biosensors and Bioelectronics, Vol.26;4, 2010). 이때, NaCl을 첨가해주면 타겟을 첨가해준 튜브에서는 금 나노입자가 뭉치게 되면서 색깔 변화를 관찰할 수 있다. 반면, 타겟이 없는 튜브에서는 앵타머가 NaCl로 인한 금 나노입자의 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 nm 에서 가장 높은 흡광도를 보이는 반면에 색이 푸른 계열로 변한 후에는 650 nm 에서 가장 높은 흡광도를 보이게 된다. 따라서 650 nm 에서의 흡광도 값을 520 nm 에서의 흡광도 값으로 나눈 값은 타겟에 의해 응집(aggregation)이 일어난 정도와 비례해서 증가한다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 프로게스테론(progesterone) 농도 측정 방법의 개선을 위해 예의 연구 노력한 결과, 프로게스테론(progesterone)에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 SELEX를 통해 개발하였다. 또한, 상기 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 금 나노입자 기반 색도 분석기법에 관한 조성물을 제조하여 프로게스테론(progesterone)을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 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 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 프로게스테론(progesterone)을 특이적으로 검출할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 11 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 이용한 프로게스테론의 검출방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 프로게스테론 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머 또는 상기 복합체를 포함하는 프로게스테론 검출용 조성물, 센서, 및 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하여 체내의 프로게스테론(progesterone)을 보다 간편하게 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 프로게스테론 검출 방법 및 장치에 이용하여 극소량의 프로게스테론이 포함되어 있는 시료에서 타겟을 선택적으로 측정할 수 있다. 따라서, 인간의 혈중 내에 존재하는 프로게스테론(progesterone) 농도를 쉽고 빠르게 측정함으로써 프로게스테론(progesterone) 결핍 또는 과다 관련 질병 진단에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 앵타머를 이용한 금 나노입자 기반의 색도 분석법을 나타낸 것이다.

도 2는 자성비드를 이용하여 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머 제조 과정의 모식도이다.

도 3은 selection round 에서부터 얻어진 프로게스테론(progesterone)에 결합하는 ssDNA의 양이 증가함을 보여주는 그래프이다

도 4 내지 도 14는 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 11의 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 15는 DNA 앵타머 PG(11)-79를 이용한 프로게스테론(progesterone)과 카운터 타겟 [코르티코스테론(corticosterone), 테스토스테론(testosterone)]의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 DNA 앵타머 PG(11)-79를 이용한 다양한 프로게스테론(progesterone) 농도의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 선행문헌에서 개발한 앵타머를 이용한 프로게스테론(progesterone)과 카운터 타겟 [코르티코스테론(corticosterone), 테스토스테론(testosterone)]의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 선행문헌에서 개발한 앵타머를 이용한 다양한 프로게스테론(progesterone) 농도의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

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.

[0022] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 Flu-mag SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다. 그 결과, 서열번호 1 내지 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 상기 프로게스테론에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 일 실시예에서는, 프로게스테론에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 Flu-mag SELEX 프로세스를 이용하여 선별한 것이다.

[0023] 본 발명의 용어 “Flu-mag SELEX 프로세스”란 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 자성 비드에 고정화된 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법(Javed H. Niazi, Su Jin Lee, Man Bock Gu (2008), Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16,15,7245-7253)을 말한다.

[0024] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 11 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명의 핵산 앵타머는 Flu-mag SELEX 공정에 의해 선택된, 프로게스테론 (progesterone)에 특이적으로 결합

하는 임의의 염기서열의 핵산 앵타머일 수 있다.

- [0027] 더욱 구체적으로, 본 발명의 프로게스테론 (progesterone)에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 핵산 앵타머는 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다:
- [0028] a) 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 핵산 풀(pool)과 카운터 타겟물질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;
- [0029] b) 상기 혼합액에 그래핀을 첨가하여 카운터 타겟물질에 결합하지 않는 단일가닥 핵산이 그래핀 표면에 흡착하도록 유도하는 단계;
- [0030] c) 상기 카운터 타겟물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 핵산을 제거하고, 프로게스테론을 첨가하여 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 핵산에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리하는 단계
- [0031] d) 상기 단계에서 얻은 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 상기 PCR용 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 단계; 및
- [0032] e) 상기 단계에서 얻은 PCR 생산물로부터 단일가닥 핵산을 분리하고 상기 단일가닥 핵산을 a) 단계의 혼합액에 첨가하여 그래핀 기반 선별과정을 반복 수행하는 단계.
- [0033] 상기 핵산 앵타머 제조방법의 d) 단계에서, 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 기 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 프로게스테론의 검출방법에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 시료는 포유류, 바람직하게는 인체에서 분리된 것으로, 최소 침습으로 확보가능한 시료 또는 분비체액, in vitro 세포배양액 성분 시료 등 프로게스테론을 포함하고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다. 보다 바람직하게는 혈액일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 검출은 금 나노입자 기반의 색도 분석 방식으로 검출하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 검출은 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 특성을 이용하여 프로게스테론을 검출할 수 있다.
- [0038] 상기 검출은 또한, 금칩(gold chip)을 이용한 자기공명분석 SPR (Surface Plasmon Resonance) 장비로 프로게스테론을 검출할 수 있다. 즉, 금칩 (gold chip)에 앵타머를 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 증가하는 response unit 값을 측정하는 방식을 이용하여 프로게스테론을 검출할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 앵타머는 이 기술분야에서 이미 공지된 방법에 의해 화학 합성할 수도 있다.
- [0041] 본 발명의 핵산 앵타머는, 프로게스테론에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오타이드의 당 잔기(예를 들어, 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, O-알킬화(예, O-메틸화, O-에틸화), O-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 (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).
- [0042] 본 발명의 핵산 앵타머는 또한 프로게스테론에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기 (예를 들면, 푸린, 피

리미딘)가 변형 (예를 들면, 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.

[0043] 또한, 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성을 갖도록, 본 발명의 핵산 앵타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대, P(O)O기가, P(O)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(O)NR₂(아미데이트), P(O)R, R(O)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.

[0044] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.

[0045] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일 (Myristoyl), 리소콜릭-올레일 (Lithocolic-oleyl), 도코사닐 (Docosanyl), 라우로일 (Lauroyl), 스테아로일 (Stearoyl), 팔미토일 (Palmitoyl), 올레오일 (Oleoyl), 리놀레오일 (Linoleoyl), 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 항암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 변형에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.

[0047] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 서열번호 1 내지 11로 표시되는 핵산 앵타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 11로 표시되는 핵산 앵타머인 PG(11)-79에 대하여, 금 나노입자 기반 색도 분석을 수행한 결과, 프로게스테론에 해당 앵타머가 특이적으로 결합함을 확인하였다.

[0048] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 프로게스테론 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0049] 본 발명에 있어서, 프로게스테론 관련 질환은 프로게스테론의 농도가 정상 범위를 벗어나게 되어 발생하는 질환이면 모두 이용 가능하나, 바람직하게는 생리불순, 생리통, 부정출혈, 월경전증후군, 불임, 피부암, 여드름, 우울증, 노화 및 수면장애로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 프로게스테론 관련 질환의 진단은 상기 앵타머와 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨 중에서 선택되는 시료와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 시료는 포유류, 바람직하게는 인체에서 분리된 것으로, 최소 침습으로 확보가 가능한 시료 또는 분비체액, *in vitro* 세포배양액 성분 시료 등 프로게스테론을 포함하고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다.

[0052] 본 발명은 또 다른 관점에서 본 발명의 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 고상 담체는 기관, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 및 다공재질인 고상 담체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 기관은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관, 유리 기관, 아파타이트 (apatite) 기관, 실리콘 기관, 금 기관, 은 기관 및 알루미늄 기관으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 기관은 칩이나 단백질 칩 등에 사용되고 있는 것 등일 수 있고, 예컨대 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관이나 유리 기관, 아파타이트 (apatite) 기관, 실리콘 기관, 금, 은 또는 알루미늄 기관 등으로, 이들의 기관에 폴리머 등의 코팅을 실시한 것을 들 수 있다.

[0056] 상기 수지는 아가로스 (agarose) 입자, 실리카 입자, 아크릴아미드와 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 폴리스티렌 가교 디비닐벤젠 입자, 텍스트란을 에피클로로히드린으로 가교한 입자, 셀룰로오스파이버, 알릴텍스트란과 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 가교폴리머, 단분산계 합성폴리머, 단분산계 친수성폴리머, 세파로오스 (Sephacrose) 또는 토요펠 (Toyopearl) 등을 들 수 있고, 또한 이들의 수지에 각종 관능기를 결합시킨 수지를 사용할 수 있다.

- [0057] 상기 고상담체는 프로게스테론의 정제, 프로게스테론의 단백질의 검출 또는 정량에 유용할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 핵산 앵타머는 공지의 방법에 의해 고상담체에 고정할 수 있다. 예컨대, 친화성 물질이나 소정의 관능기를 본 발명의 앵타머에 도입하고, 계속해서 이 친화성 물질이나 소정의 관능기를 이용하여 고상담체에 고정화하는 방법을 들 수 있다. 소정의 관능기는 커플링 반응에 제공하는 것이 가능한 관능기일 수 있고, 예컨대 아미노기, 티올기, 히드록실기, 카르복실기를 들 수 있다. 예를 들어, 상기 앵타머의 말단에 바이오틴을 결합시켜 복합체를 형성하고, 상기 칩 등의 기관 표면에 스트렙타비딘을 고정화시켜, 상기 바이오틴과 기관 표면에 고정화된 스트렙타비딘의 상호작용에 의하여 상기 앵타머를 기관 표면에 고정화시킬 수 있다.
- [0059] 앵타머가 고정화된 고상담체를 이용하여 프로게스테론 단백질을 검출하는 방법은, 예를 들어, 본 발명의 DNA 앵타머를 칩(chip)상에 형광물질, 발색물질 또는 항체 등과 함께 스팟팅 한 후 혈액샘플을 반응시킴으로써 검출 시료, 예를 들어, 혈액 중에 포함된 미량의 프로게스테론의 수준을 신속하게 측정할 수 있다. 또 다른 방법으로는 자성 비드에 상기 DNA 앵타머를 고정화시켜 프로게스테론을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-프로게스테론 복합체를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 프로게스테론을 분리함으로써 프로게스테론만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.
- [0061] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 포함하는 프로게스테론 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0062] 본 발명의 프로게스테론 검출용 조성물은 프로게스테론을 검출하기 위한 것으로, 프로게스테론의 검출을 위해 본 발명의 핵산 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 앵타머를 자성 비드에 고정화시켜 프로게스테론을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-프로게스테론 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 프로게스테론을 분리함으로써 프로게스테론만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.
- [0063] 본 발명의 조성물을 이용하는 프로게스테론의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 핵산 앵타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 프로게스테론을 포함하는 시료를 통과시켜 프로게스테론만을 선택적으로 제거할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 다른 실시 예에서는 상기 서열번호 1 내지 11로 표시되는 핵산 앵타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 11로 표시되는 핵산서열인 앵타머 PG(11)-79에 대하여 금 나노입자 기반 색도분석을 수행한 결과, 프로게스테론에 특이적으로 결합함을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 상기 프로게스테론에 특이적으로 결합하는 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 함유하는 프로게스테론의 검출센서에 관한 것이다.
- [0066] 상기 프로게스테론에 특이적으로 결합하는 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 함유하는 검출 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 프로게스테론 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.
- [0067] 본 발명에 따른 프로게스테론에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 프로게스테론만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 프로게스테론의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.
- [0068] 본 발명은 또 다른 관점에서, 프로게스테론에 특이적으로 결합하는 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 이용한 프로게스테론의 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 프로게스테론이 포함된 시료를 통과시켜 프로게스테론을 제거할 수 있다.

- [0070] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0072] **실시예 1: 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성**
- [0073] 56mer DNA pool로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역(primer region)이 있고 중앙에 임의의 염기를 가진 DNA pool을 아래와 같은 방법으로 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA pool은 Genotech Inc. Korea에 화학적으로 합성을 의뢰하였다.
- [0074] CGGCAATGGTCTTAGAGG -random region- CGCTTGATTGGACTGGAC
- [0076] 서열번호 12: CGGCAATGGTCTTAGAGG
- [0077] 서열번호 13: CGCTTGATTGGACTGGAC
- [0079] **실시예 2: Flu-mag SELEX 프로세스를 이용한 프로게스테론(progesterone) 에 특이 DNA 앵타머의 선별**
- [0080] 실시예 1에서 합성된 랜덤 DNA pool을 자성 비드에 고정화 된 타겟 [프로게스테론(progesterone)] 과 버퍼용액 (20mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mMKCl, 1mMNaCl₂, 0.02%Tween20)에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 타겟과 결합하지 않은 DNA를 확보하기 위해 위의 혼합액의 상층액을 제거하였다.
- [0081] 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합하는 DNA를 확보하기 위해 자성비드-프로게스테론(progesterone)-DNA 에 버퍼용액을 넣어준 후, 80℃ 에서 10분간 반응시킴으로써 DNA의 배좌 변위 (Conformational change)를 유발시켜 타겟으로부터 분리한 다음, 에탄올 침전법으로 타겟 특이적DNA를 확보하였다.
- [0082] 카운터 단계는 자성 비드에 카운터 타겟 [코르티코스테론(corticosterone), 또는 테스토스테론(testosterone)] 을 고정시켜 위의 DNA pool을 버퍼용액과 함께 반응시킨 후, 상층액을 다시 프로게스테론(progesterone) 과 반응시키는 방법으로 진행하였다. 이렇게 얻어진 프로게스테론(progesterone) 에 특이적으로 결합하는 DNA의 양을 측정하한 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 각 선별단계 (selection round) 에서 얻어진 프로게스테론(progesterone) 에 결합하는 DNA의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0084] **실시예 3: 프로게스테론(progesterone) 에 결합 가능한 DNA 앵타머 pool의 제조**
- [0085] 프로게스테론(progesterone) 와 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다.
- [0086] PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.
- [0087] forward (APTFf) 5-fluorescein- CGGCAATGGTCTTAGAGG-3
- [0088] : 서열번호12
- [0089] reverse (APTR) 5- CGCTTGATTGGACTGGAC-3: 서열번호 13
- [0090] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후, 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 실시하였다.
- [0091] 10%의 폴리아크릴아마이드 젤에는 6M의 요소(urea), 20%의 포름아마이드(formamaid)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.

[0092] 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 타겟이 들어 있는 버퍼용액과 혼합하여 새로운 선별과정을 시작한다. 이러한 과정의 모식도를 도 2 에 나타내었고, 일련의 과정(SELEX process)을 한 번의 선별 (selection)이라 하면 Flu-mag SELEX 는 총 8번의 선별과정과 2번의 카운터 선별과정을 거쳐 프로게스테론(progesterone) 에 결합하는 DNA pool을 얻었다.

[0093] 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Qiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과 프로게스테론(progesterone) 에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 확보하였다.

[0095] 실시예 4: DNA 앵타머의 염기서열 분석 및 특이성 분석

[0096] 프로게스테론(progesterone) 에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1에 제시하였다. 또한, 이 프로게스테론(progesterone) 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 4 내지 도 14에 나타내었다.

표 1

[0097] 프로게스테론(progesterone) 에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머의 염기서열

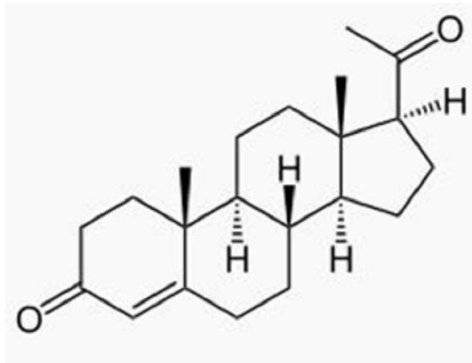
서열번호	앵타머	염기서열
1	PG(7)-7	CGGCAATGGTCTTAGAGGGGGGGTGGGTGGAAAGCTGCCGCTTGATTGGACTGGAC
2	PG(7)-9	CGGCAATGGTCTTAGAGGCGCACGTCGGGAATAAAGCCGCTTGATTGGACTGGAC
3	PG(7)-13	CGGCAATGGTCTTAGAGGGTGGGTGGGTGGAGACATGGCGCTTGATTGGACTGGAC
4	PG(10)-3	CGGCAATGGTCTTAGAGGCCATAGCAGGACCTGCTTCCCGCTTGATTGGACTGGAC
5	PG(10)-4	CGGCAATGGTCTTAGAGGGCGGGTGGGTGGAGAGTTGCCGCTTGATTGGACTGGAC
6	PG(10)-6	CGGCAATGGTCTTAGAGGCCCGGAACGCCACCCCTACCGCTTGATTGGACTGGAC
7	PG(10)-19	CGGCAATGGTCTTAGAGGGTGGGCGGGTGGTTCGTTGCCGCTTGATTGGACTGGAC
8	PG(11)-31	CGGCAATGGTCTTAGAGGGGGTGGGTGGGAGGTGTGCCGCTTGATTGGACTGGAC
9	PG(11)-35	CGGCAATGGTCTTAGAGGGCGGGTGGGTGGTGTGTTGCCGCTTGATTGGACTGGAC
10	PG(11)-71	CGGCAATGGTCTTAGAGGGCGGGTGGGTGGTGTGTTGCCGCTTGATTGGACTGGAC
11	PG(11)-79	CGGCAATGGTCTTAGAGGGCCGATTGTCGCTACCGGCCGCTTGATTGGACTGGAC

[0098] 상기의 DNA 앵타머가 프로게스테론(progesterone) 에 대한 특이성이 있는지를 확인하였다.

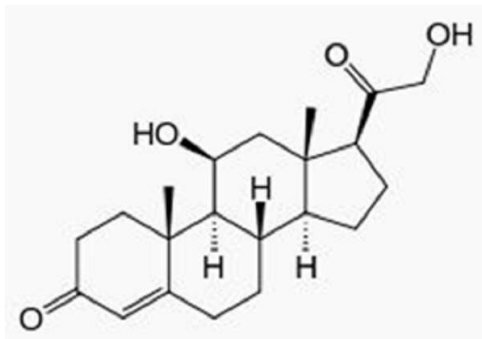
[0099] 2.4nM의 금 나노입자와 앵타머를 상온에서 30분간 반응시킨 후 50uM의 프로게스테론(progesterone) [화학식 1], 코르티코스테론(corticosterone)[화학식2], 테스토스테론(testosterone)[화학식3] 을 첨가해 추가로 30분간 반응시켰다.

[0100] 상기 용액에 0.0625M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정함으로써, 앵타머와 프로게스테론(progesterone) 과의 특이성을 확인한 결과, 도 16에 개시된 바와 같이, 본 발명의 앵타머가 프로게스테론에 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

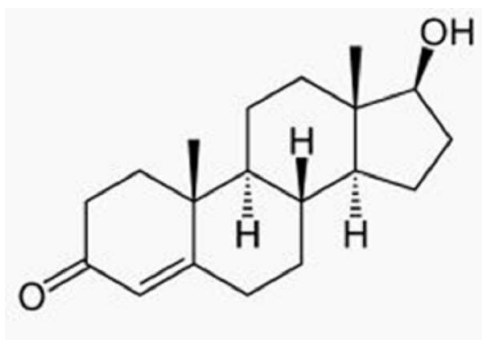
화학식 1



화학식 2



화학식 3



실시예 5: DNA 앵타머의 프로게스테론(progesterone) 과의 결합력 분석

서로 다른 11종의 프로게스테론(progesterone) 에 특이적으로 결합하는 앵타머 중에서 가장 특이도가 높은 앵타머인 PG(11)-79 앵타머와 다양한 농도의 프로게스테론(progesterone) 과의 결합을 분석하였다.

80uM의 프로게스테론과 10uM의 프로게스테론 결합 앵타머를 상온에서 10분간 흡착 반응시킨 후, 11nM의 금 나노입자를 첨가하여 5분간 반응시켰다. 상기 용액에 0.0625M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정된 결과, 도 16에 개시된 바와 같이 본 발명의 앵타머는 농도에 비례하여, 프로게스테론에 특이적으로 결합 할 뿐만 아니라, LOD(limit of Detection) 값이 5.69uM로, 매우 낮은 농도의 프로게스테론을 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0108] 실시예 6: 공지된 DNA 앵타머의 프로게스테론(progesterone) 과의 특이성 및 결합력 분석

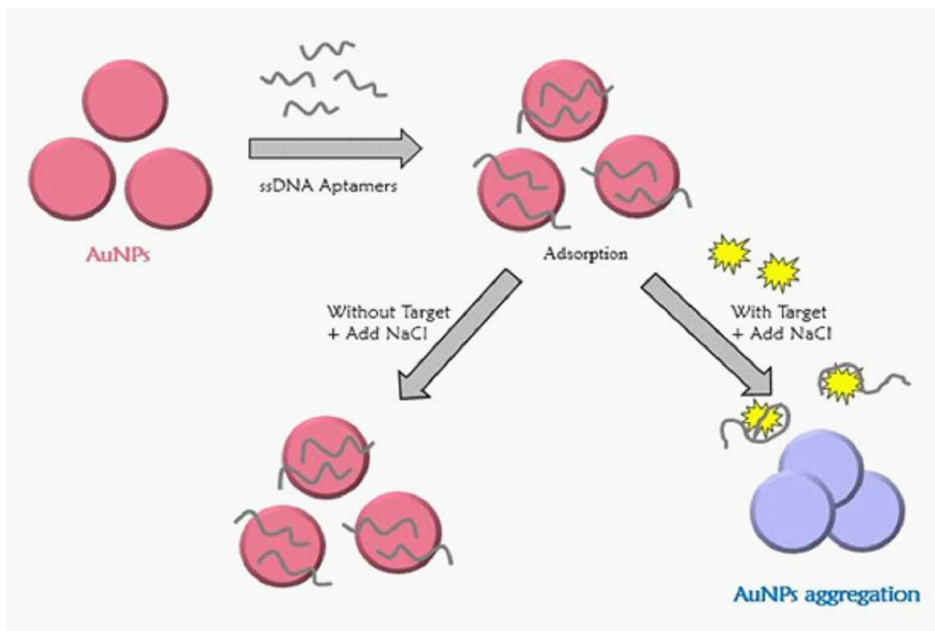
[0109] 프로게스테론(progesterone)에 특이적으로 결합한다고 공지된 앵타머 중, 가장 결합력과 특이도가 높다고 알려진 앵타머(P4G11, Gaston Contreras Jimenez et al., Anal. Chem. Vol.87 pp.1075-1082, 2015)를 선별하여 실시예 5 및 실시예 6의 방법으로 실험하여 본 발명의 앵타머와 비교하였다.

[0110] 그 결과, 상기 앵타머는 도 17에 개시된 바와 같이, 프로게스테론 뿐만 아니라, 코르티코스테론에도 유사한 특이성을 나타내는 것을 확인하였으며, 그 농도에 따른 결합력을 측정한 결과 도 17에 개시된 바와 같이 LOD(Limit of Detection) 값이 6.19uM으로 본원 발명에 비해 훨씬 높아, 결합력이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

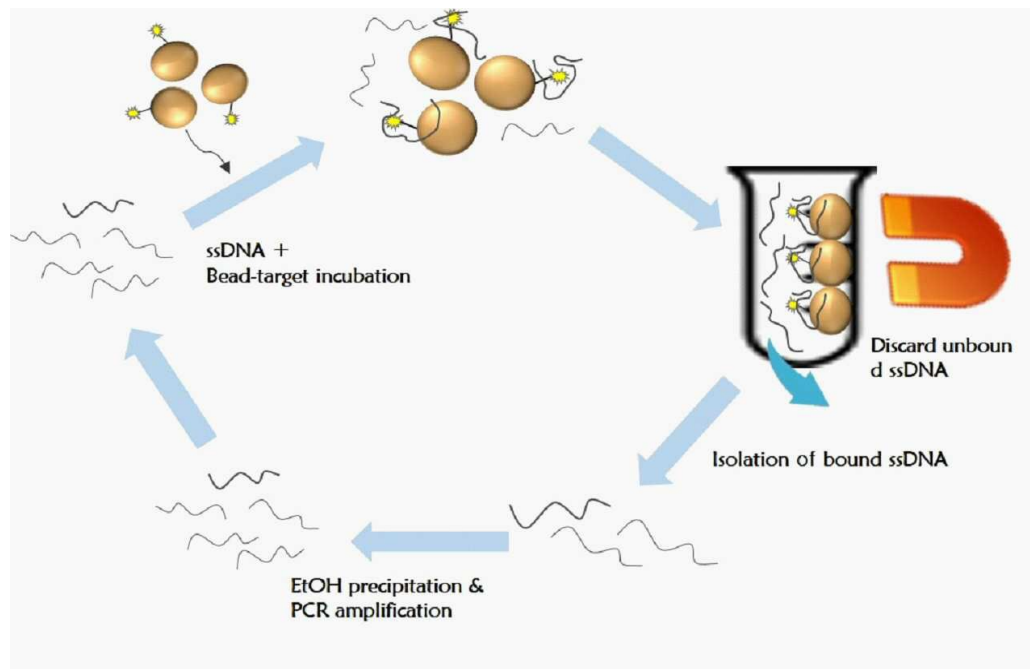
[0111] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

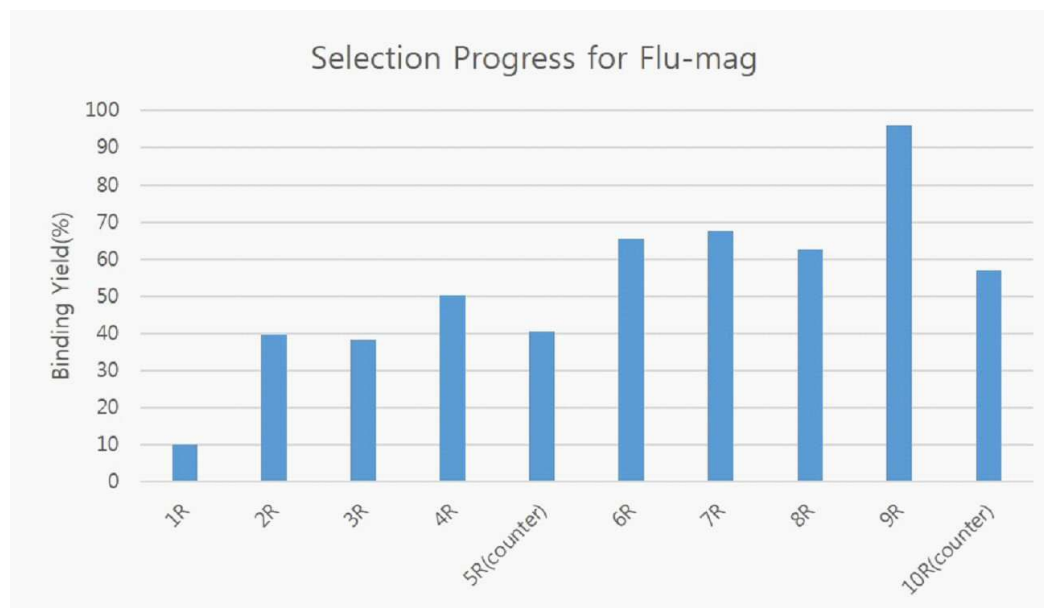
도면1



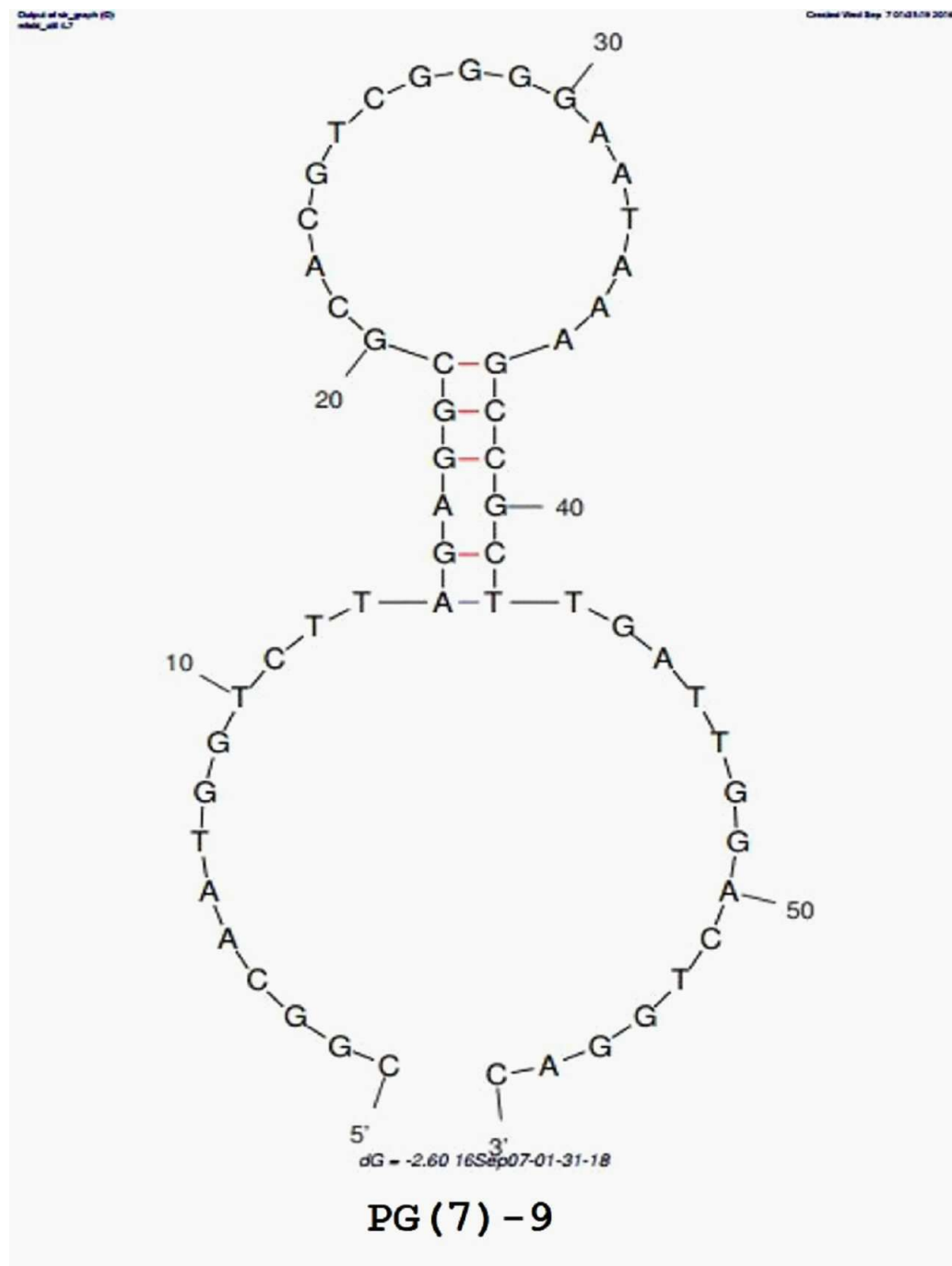
도면2



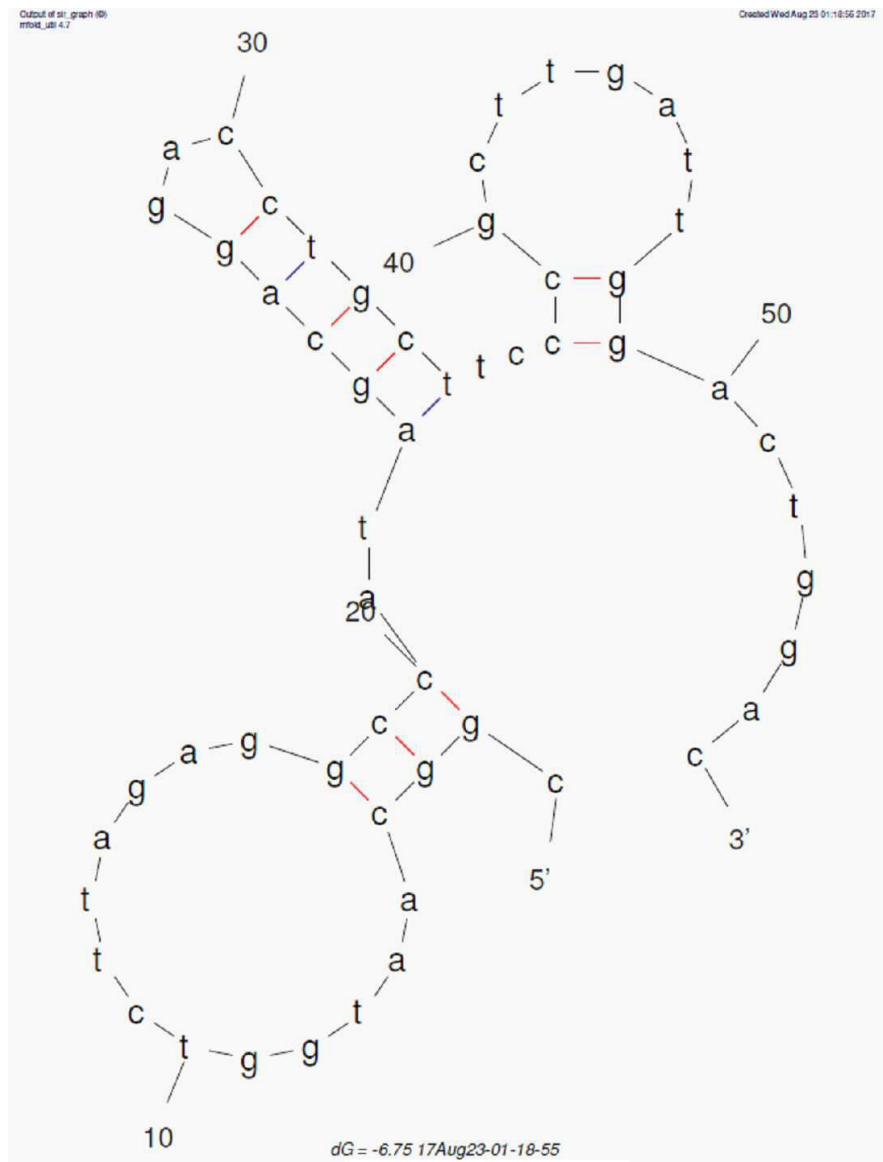
도면3



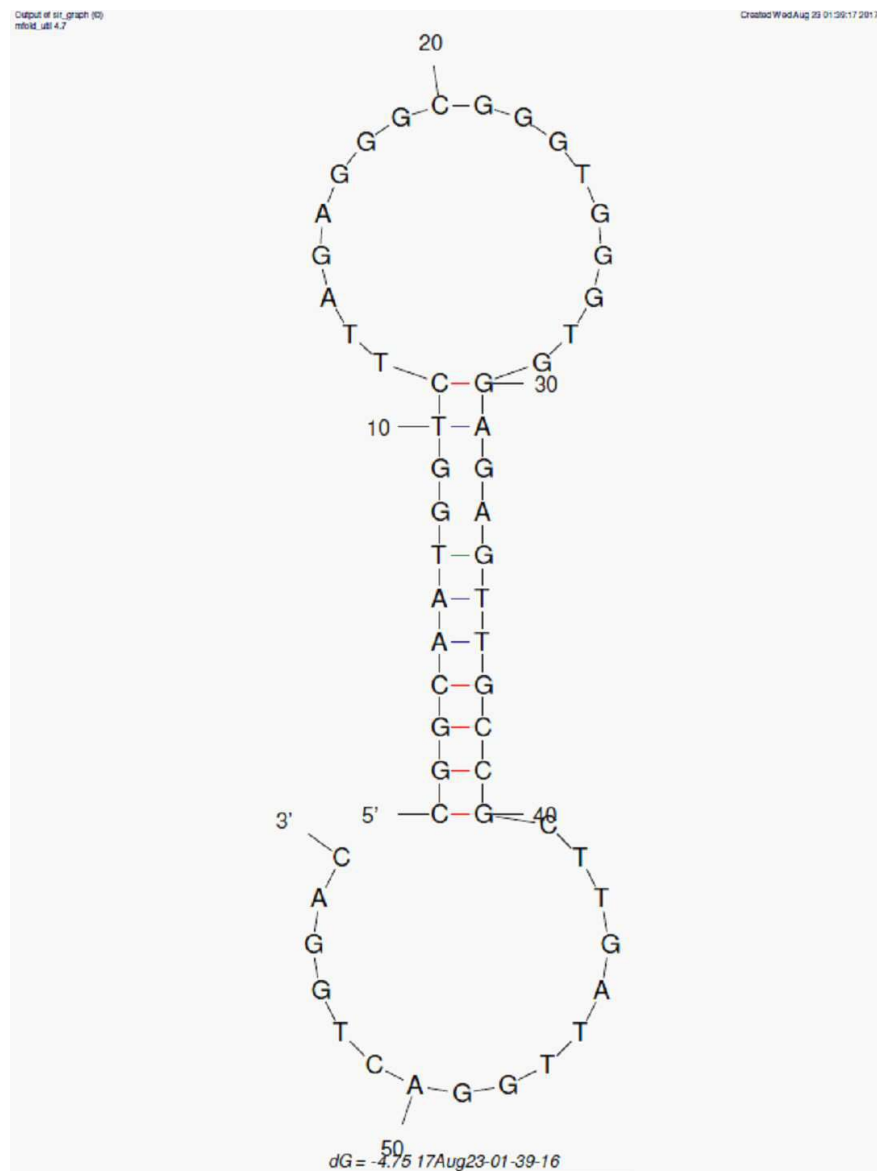
도면5



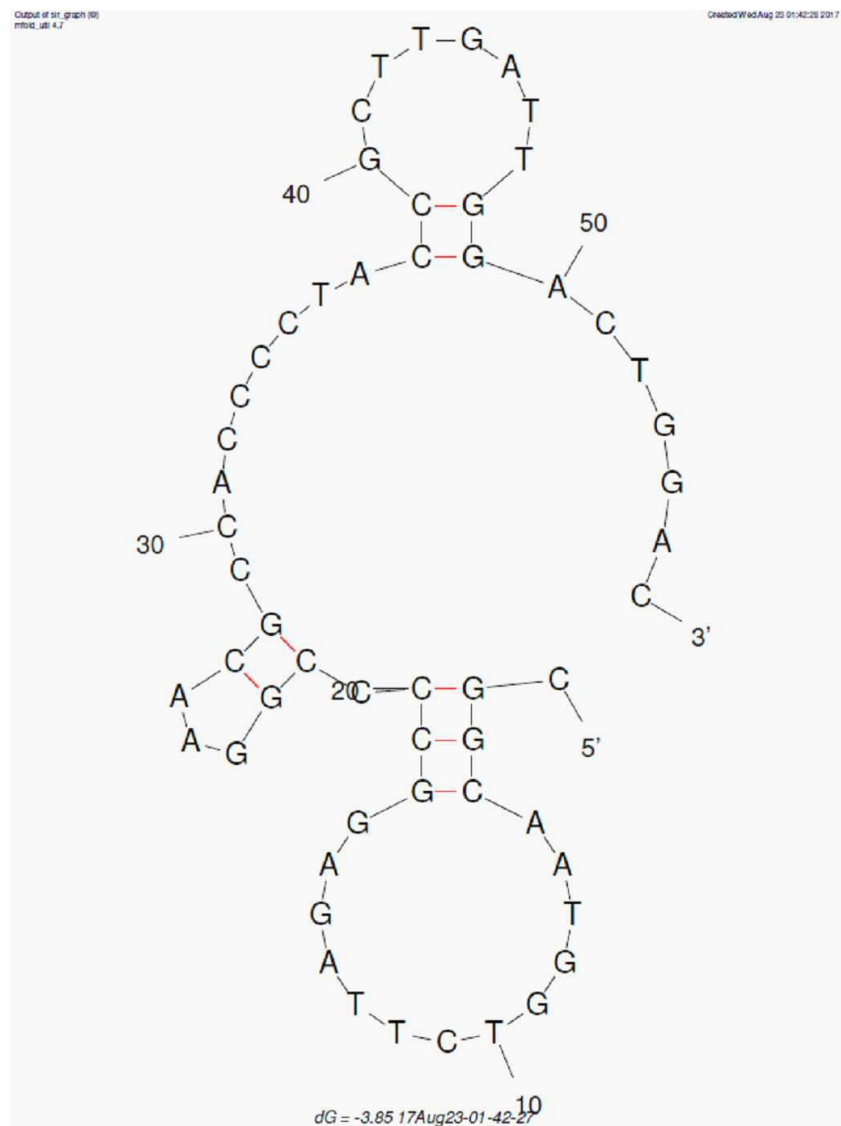
도면7



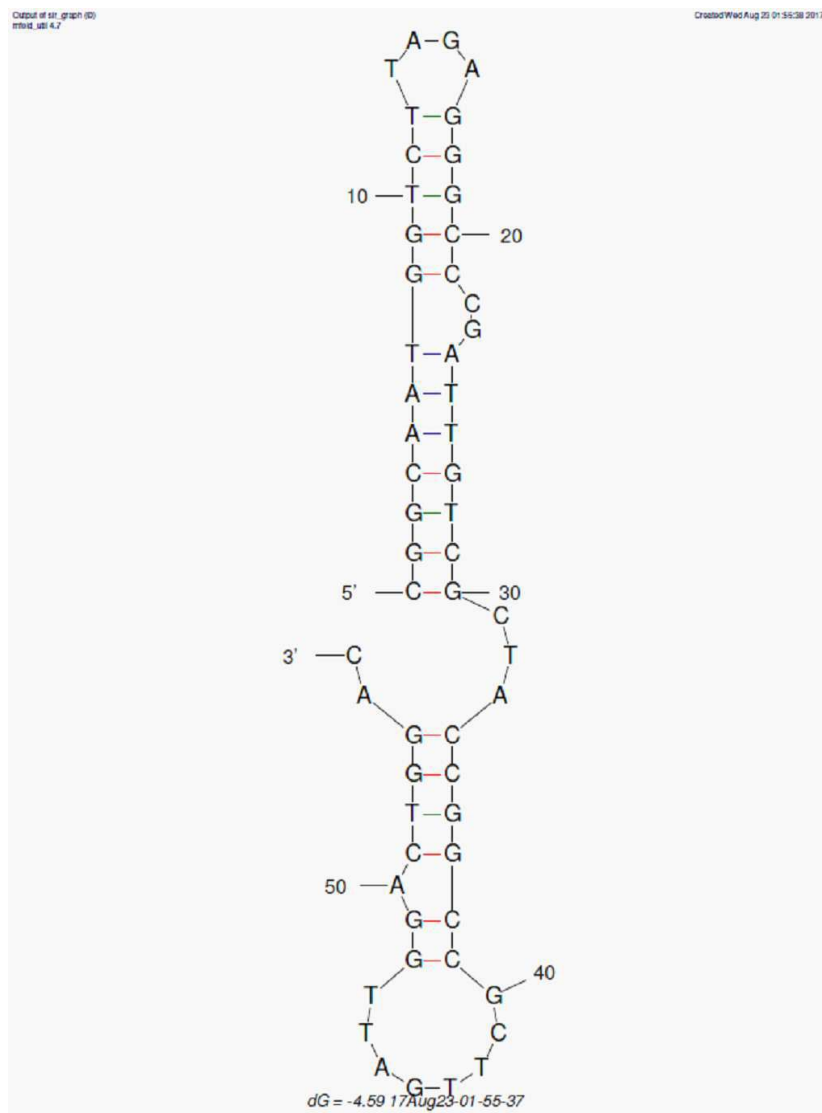
도면8



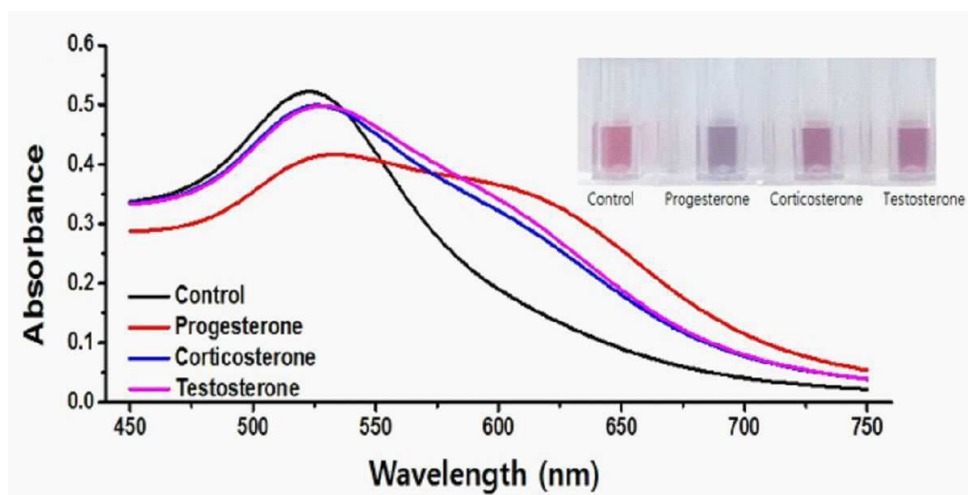
도면9



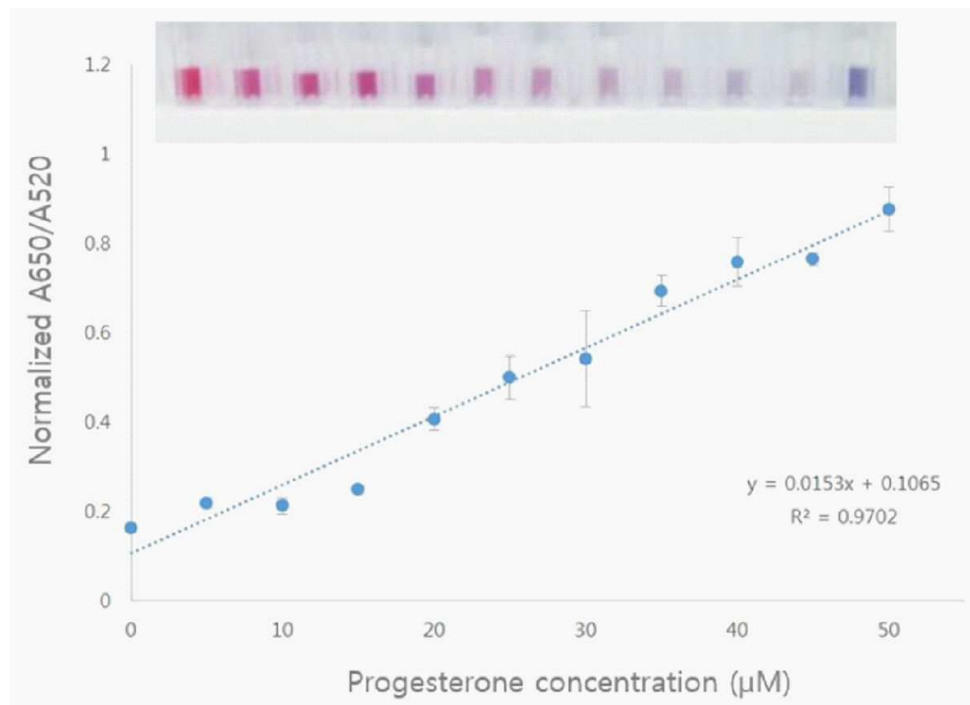
도면14



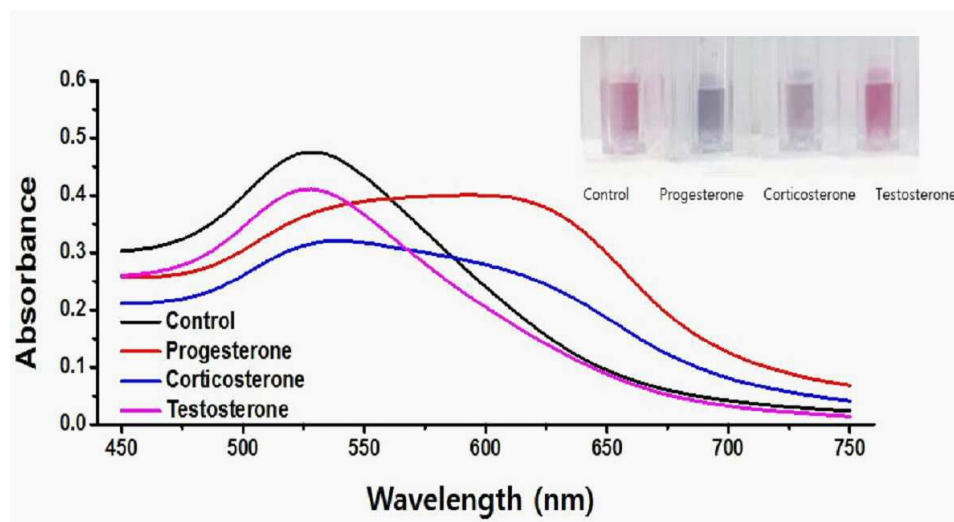
도면15



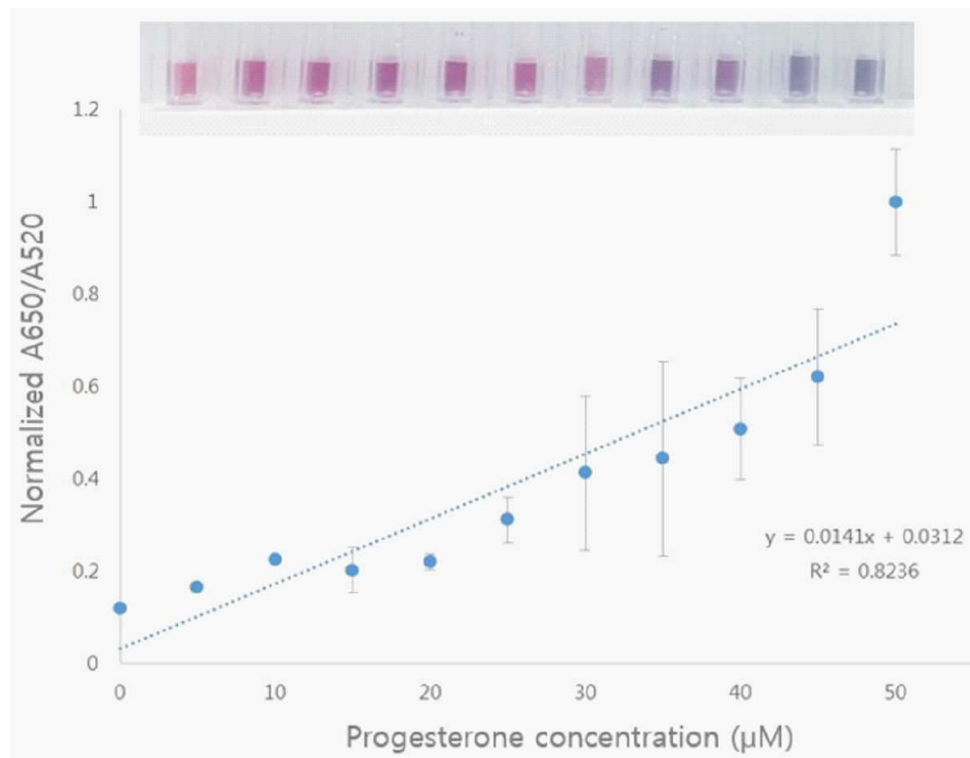
도면16



도면17



도면18



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> DNA aptamer binding to progesterone with specificity and Uses thereof
- <130> P17-B192
- <150> KR 10-2016-0129111
- <151> 2016-10-06
- <160> 13
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 56
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PG(7)-7
- <400> 1

cggcaatggt cttagagggg ggggtgggtgg aaagctgccg cttgattgga ctggac

56

- <210> 2
- <211> 56
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PG(7)-9

<400> 2

cggcaatggt cttagaggcg cacgtcgggg aataaagccg cttgattgga ctggac 56

<210> 3

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PG(7)-13

<400> 3

cggcaatggt cttagagggt gggtaggggtgg agacatggcg cttgattgga ctggac 56

<210> 4

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PG(10)-3

<400> 4

cggcaatggt cttagaggcc atagcaggac ctgcttcccg cttgattgga ctggac 56

<210> 5

<211>

> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PG(10)-4

<400> 5

cggcaatggt cttagaggcg gggtaggggtgg agagttgccg cttgattgga ctggac 56

<210> 6

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PG(10)-6

<400> 6

cggcaatggt cttagaggcc ccggaacgcc acccctaccg cttgattgga ctggac 56

<210> 7

<211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PG(10)-19
 <400> 7
 cggcaatggt cttagagggt gggcgggtgg ttcgttgccg cttgattgga ctggac 56

<210> 8
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PG(11)-31
 <400> 8
 cggcaatggt cttagagggg ggtgggtggg aggtgtgccg cttgattgga ctggac 56

<210> 9
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PG(11)-35
 <400> 9
 cggcaatggt cttagagggc ggtgggtggg tgtgttgccg cttgattgga ctggac 56

<210> 10
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PG(11)-71
 <400> 10
 cggcaatggt cttagagggc ggtgggtggg tgtgttgccg cttgattgga ctggac 56

<210> 11
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PG(11)-79
 <400> 11

cggcaatggt cttagagggc ccgattgtcg ctaccggccg cttgattgga ctggac	56
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward	
<400> 12	
cggcaatggt cttagagg	18
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse	
<400> 13	
cgcttgattg gactggac	18