



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0014363
(43) 공개일자 2022년02월07일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 15/115</i> (2010.01) <i>C12Q 1/6834</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12N 15/115</i> (2013.01)
<i>C12Q 1/6834</i> (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0091838</p> <p>(22) 출원일자 2020년07월23일
심사청구일자 2020년07월23일</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
구만복
서울특별시 중랑구 봉화산로30길 103-9, 401호 (상봉동, 상봉마이빌)</p> <p>토아 트란 티 탄
서울특별시 성북구 고려대로 105(안암동5가) 하나과학관, 613호</p> <p>(74) 대리인
특허법인 다해</p> |
|---|--|

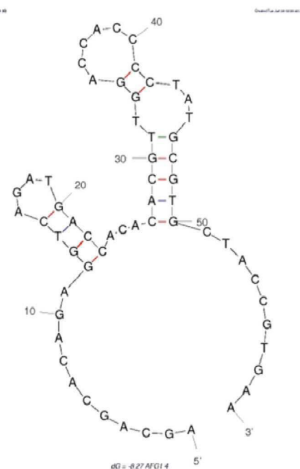
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 아플라톡신 G1에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1: AFG1)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머와 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명의 앵타머는 극소량의 AFG1이 포함되어 있는 시료에서 타겟인 AFG1만 선택적으로 검출할 수 있고, AFG1에 대한 강한 결합력을 가지는바, 시료에 포함된 AFG1의 제거에 이용될 수도 있다. 이에, 본 발명은 AFG1 관련 질병으로부터 인간 및 축산동물을 보호하는데 널리 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



AFG1-3

(52) CPC특허분류

C12Q 2563/143 (2013.01)

C12Q 2563/149 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019012776
과제번호	2019012776
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(원천)나노소재원천기술개발사업
연구과제명	식품유해물질 검출을 위한 고감도 나노바이오리포터 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.02.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머로서,
상기 DNA 앵타머는 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, DNA 앵타머.

청구항 2

제1항의 DNA 앵타머를 포함하는 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1) 검출용 조성물.

청구항 3

제1항의 DNA 앵타머 및 상기 앵타머가 고정되어 있는 기판을 포함하는 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1) 검출용 바이오센서.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 기판은 자성비드를 포함하고, 상기 앵타머는 상기 자성비드에 의해 기판에 고정되어 있는 것을 특징으로 하는, 바이오센서.

청구항 5

제1항의 DNA 앵타머가 표면에 고정된 금 나노입자(gold nanoparticle)를 유효성분으로 포함하는 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1) 검출용 조성물.

청구항 6

제1항의 DNA 앵타머가 표면에 고정된 금 나노입자(gold nanoparticle)를 포함하는 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1) 검출용 비색센서.

청구항 7

제1항의 DNA 앵타머가 표면에 고정된 금 나노입자와 시료를 반응시킨 후 색 변화를 확인하는 단계를 포함하는 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1) 검출 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 시료는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동물의 장 내부, 및 동물 또는 식물의 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에서 채취된 것을 특징으로 하는, 검출 방법.

청구항 9

제1항의 DNA 앵타머가 고정된 비드가 충전된 컬럼에 시료를 통과시키는 단계를 포함하는 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1) 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1: AFG1)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머와 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아플라톡신(Aflatoxin)은 토양, 썩어가는 식물, 건조 및 곡물에서 자라는 곰팡이인 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* 등에 의해 생산되는 독성 화학 물질로 질병과 연관성이 매우 높다. Aflatoxin은 발암성이 강한 물질 중 하나로서 노출되면 성장 장애, 발달 지연, 간 손상 및 간암을 유발한다. Aflatoxin은 주로 호두, 땅콩, 캐슈넛, 피스타치오 등이 부적절하게 보관된 제품에서 발견되며 이들이 포함되어 있는 오염된 식품은 애완동물, 사람의 식품뿐만 아니라 축산용 사료에서도 발견된다. 더 큰 문제는 이러한 오염된 사료를 섭취한 동물이 aflatoxin 변이 생성물을 알, 유제품 및 고기에 전달할 수 있다는 것이다.

[0004] 다양한 종류의 Aflatoxin이 있으며 독성의 정도는 $AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2$ 이다. 오염된 식품 및 오염된 사료를 먹은 축산동물로부터 쉽게 노출될 수 있는 aflatoxin을 경제적이면서도 간단하게 측정할 수 있는 방법을 개발하는 것이 필요하며 특히 독성이 높은 Aflatoxin B1과 Aflatoxin G1의 측정이 중요하다.

[0005] 앵타머(aptamer)는 10^{12-14} 정도의 다양성을 가지는 랜덤 핵산 라이브러리로부터 얻어지는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일 가닥 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 잔류 농약의 검출방법에 도입하기에 매우 적절한 물질이며, 이를 활용한 나노 바이오 기술을 통해 특정 잔류 농약 물질을 검출하는데도 응용할 수 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. 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 가까워지면서 응집(aggregation)이 일어나고 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.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) CN 201710347248.9

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1: AFG1)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제공하여, AFG1 검출용 조성물, 센서, 및 AFG1 검출방법을 제공하고, AFG1의 분리 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1: AFG1)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 DNA 앵타머는 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 DNA 앵타머를 포함하는 AFG1 검출용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 DNA 앵타머가 고정되어 있는 기판을 포함하는 AFG1 검출용 바이오센서를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 기판은 자성비드를 포함하고, 상기 앵타머는 상기자성비드에 의해 기판에 고정된 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 DNA 앵타머가 표면에 고정된 금 나노입자를 유효성분으로 포함하는 AFG1 검출용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 DNA 앵타머가 표면에 고정된 금 나노입자를 포함하는 AFG1 검출용 비색센서를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 비색센서와 시료를 접촉시킨 후 센서의 색 변화를 확인하는 단계를 포함하는 AFG1 검출 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 시료는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동물의 장 내부, 및 동물 또는 식물의 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에서 채취된 것일 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 DNA 앵타머가 고정된 비드가 충전된 컬럼에 시료를 통과시키는 단계를 포함하는 AFG1 분리방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명자는 AFG1(Aflatoxin G1)에 대한 높은 결합력을 갖는 앵타머를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 변형된 GO-SELEX 기법을 이용하여 앵타머를 AFG1에 대한 강한 결합력을 갖고 앵타머를 선별하고, 선별된 앵타머에서 AFG1에 대한 높은 민감도와 특이도를 확인하여 본 발명을 완성하였다. 본 발명의 앵타머는 극소량의 AFG1이 포함되어 있는 시료에서 타겟인 AFG1만 선택적으로 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 앵타머는 AFG1에 대한 강한 결합력을 가지는데, 시료에 포함된 AFG1의 제거에 이용될 수도 있다. 이에, 본 발명은 AFG1 관련 질병으로부터 인간 및 축산동물을 보호하는데 널리 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 앵타머를 이용한 금 나노입자 기반의 색도 분석법을 나타낸 것이다.
- 도 2는 변형된 GO-SELEX 방법을 이용하여, Aflatoxin G1 (AFG1)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머 제조 과정의 모식도이다.
- 도 3은 각 selection round 에서부터 얻어진 Aflatoxin G1 (AFG1)에 결합하는 ssDNA의 비율이 증가함을 보여주는 그래프이다
- 도 4 내지 도 10은 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 7의 Aflatoxin G1 (AFG1)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 11은 DNA 앵타머 AFG1-2를 이용한 다양한 검출시료(AFG1, AFB1, 및 AFB2)의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 DNA 앵타머 AFG1-2를 이용한 다양한 Aflatoxin G1 (AFG1) 농도의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 DNA 앵타머 AFG1-3을 이용한 다양한 검출시료(AFG1, AFB1, 및 AFB2)의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 DNA 앵타머 AFG1-3을 이용한 다양한 Aflatoxin G1 (AFG1) 농도의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 DNA 앵타머 AFG1-3과 공지의 앵타머(A26 및 A34)의 AFG1에 대한 민감도 확인을 위 다양한 농도 AFG1를 금 나노입자 기반 색도 분석을 통해 검출한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 DNA 앵타머 AFG1-3과 공지의 앵타머(A26 및 A34)의 AFG1에 대한 특이도 확인을 AFG1, AFB1 또는 AFB2를 금 나노입자 기반 색도 분석을 통해 검출한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 대표적인 주요 진균독인 아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1: AFG1)에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 변형된 GO-SELEX 방법을 통해 개발하였다. 또한, 상기 AFG1에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 금 나노입자 기반 색도 분석기법에 관한 조성물을 제조하여 AFG1를 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0027] 본 발명자들은 AFG1에 보다 높은 결합력을 갖고 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머의 발굴을 위하여 변형된 GO-SELEX 방법을 개발하였다.
- [0028] 전통적인 SELEX는 특정 타겟에 특이적으로 결합하는 앵타머의 개발에 이용되는 방법으로서, 고정된 타겟과 DNA (또는 RNA) 랜덤 라이브러리를 혼합하고 타겟과 결합한 DNA의 구조와 서열을 확인하는 기술이다. 일반적인 SELEX에서 가장 중요한 단계는 타겟에 결합한 DNA와 결합하지 않은 것을 구별하는 것인데 이를 위하여 타겟을 고정하거나 DNA 랜덤 라이브러리를 고정하는 단계가 필수적이다. 그러나, 이러한 고정화 방식은 낮은 고정화 수율과 고정화 수율 자체를 분석하는데 소모되는 시간과 비용, 그리고 고정화에 사용되는 분리용 물질(자성 비드, 컬럼 등)에 DNA가 직접 결합할 가능성과 분리용 물질에 고정된 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리하는 과정에서 나타날 수 있는 DNA 풀 손실의 가능성을 배제하기 어려운 문제가 있다. 또한, 고정화 자체가 어려운 중금속 이온 등은 전통적인 SELEX 방법으로는 개발이 어렵다는 문제가 있다. 이에, 고정화 단계에서 발생하는 문제를 해결하고 타겟의 제한이 없는 앵타머 개발을 위한 새로운 기술의 개발이 요구되어 왔다.
- [0029] SELEX 방법에서 고정화 단계의 문제점 해결을 위해 본 발명자들은 비고정화 방식으로 앵타머를 개발할 수 있는 방법에 대해 예의연구하여 그래핀을 이용한 비고정화 방식인 GO-SELEX 방법을 개발한바 있다. 그래핀은 2차원 구조의 탄소 구조체로서 열안정성, 전기적 특성 및 강도가 매우 우수하며 단일가닥 DNA의 염기 부분과 π - π 스태킹을 통해 결합할 수 있다. GO-SELEX 방법은 임의적으로 합성된 DNA(또는 RNA) 집합에서 특정 분자에 대한 높은 결합력을 지니는 DNA를 선별하여 증폭시켜 해당 분자의 DNA 결합 서열을 분석하는 방법이다(J.W. Park, R.Tatavarty, D.W.Kim, H.T.Jung and M.B.Gu (2012), Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide, Chemical Communications, 48,15,2071-2073).
- [0030] 본 발명자들은 GO-SELEX 방법에 의한 앵타머 개발에 있어 타겟에 대한 친화력과 민감도를 높이기 위하여 변형된 GO-SELEX를 개발하였다.
- [0031] 본 발명에서 '변형된 GO-SELEX' 방법은 그래핀에 강한 흡착력을 갖는 타겟을 대상으로, 그래핀과 타겟(AFG1)의 비특이적 결합을 유도하고 무작위 DNA 라이브러리를 혼합하여 반응시킴으로써 1차적으로 타겟과 친화력을 갖는 DNA를 선별하고, 이어서 타겟을 추가로 첨가하여 첨가된 타겟과 함께 분리되는 DNA를 수득하는 2차 선별단계를 통해 선별된 DNA의 서열을 분석하는 앵타머 개발 방법이다.
- [0032] 즉, 본 발명에서 '변형된 GO-SELEX'는 하기의 단계를 포함한다.
- [0033] (1) 타겟과 그래핀을 혼합하여 비특이적 결합을 유도하는 단계;
- [0034] (2) 상기 타겟과 그래핀 혼합물에 24~44nt 길이의 랜덤 올리고뉴클레오타이드를 혼합하는 단계;
- [0035] (3) 상기 혼합물을 원심분리하여 타겟과 결합하지 않은 올리고뉴클레오타이드를 제거하는 단계; 및
- [0036] (4) 상기 혼합물에 타겟을 추가로 혼합하여 그래핀에서 분리되는 타겟과 결합한 올리고뉴클레오타이드를 수득하는 단계.

- [0037] 본 발명의 변형된 GO-SELEX 방법은 상기 (4) 단계 이후에 (5) 상기 올리고뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 올리고뉴클레오타이드의 증폭은 PCR을 통해 수행될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 (2) 단계에서 혼합하는 랜덤 올리고뉴클레오타이드는 양 말단에 PCR용 프라이머 영역을 포함할 수 있으며, 상기 (5) 단계에서 선별된 올리고뉴클레오타이드의 증폭은 상기 PCR용 프라이머 영역과 결합할 수 있는 프라이머를 혼합하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 랜덤 올리고뉴클레오타이드 말단에 위치하는 PCR용 프라이머 영역은 PCR 수행 이후의 dsDNA를 ssDNA로 분리하기 위하여 형광 트레이서(fluorescent tracer)를 포함할 수 있으며, 상기 형광 트레이서는 플루오레세인(fluorescein)일 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 변형된 GO-SELEX 방법에서 상기 (4) 단계는 (4-1) (3) 단계 이후의 혼합물에 카운터 타겟(counter target)을 혼합하여 카운터 타겟과 함께 그래핀에서 분리되는 올리고뉴클레오타이드를 제거하는 단계; 및 (4-2) 상기 혼합물에 타겟을 추가로 혼합하여 그래핀에서 분리되는 타겟과 결합한 올리고뉴클레오타이드를 수득하는 단계를 포함하여 타겟에 대한 결합특이도가 높은 앵타머를 개발할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 변형된 GO-SELEX 방법은 상기 (4) 단계의 (4-1) 및 (4-2) 단계를 2 내지 10 회 반복 수행하여 타겟과 친화력과 결합특이도가 높은 앵타머를 선별할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 GO-SELEX 방법은 그래핀에 비특이적으로 높은 결합력을 갖는 물질을 타겟 물질로 설정하여 상기 타겟 물질에 특이적인 앵타머의 개발이 가능하게 한다. 또한, 상기 타겟 물질은 전통적인 SELEX 방법과 달리 소수성 및 비극성 물질을 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명자들은 구체적인 실험에서 아플라톡신 G1(Aflatoxin G1: AFG1)을 메인 타겟으로 설정하고 상술한 변형된 GO-SELEX 방법을 수행하여 AFG1에 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별하였다. 카운터 타겟으로는 아플라톡신 B1(AFB1)과 아플라톡신 B2(AFB2)를 이용하였다. 선별된 앵타머는 서열번호 1 내지 7의 염기서열을 갖고 포함하고 있으며, 각각 AFG1-1 내지 AFG1-7로 명명하고 이중에서 AFG1-3과 AFG1 결합 앵타머로 알려진 A26과 A34와 비교하여 AFG1에 대한 결합특이도, 민감도, 및 결합력을 비교한 결과, 본 발명의 변형된 GO-SELEX 방법으로 개발된 AFG1-3 앵타머는 AFB1 및 AFB2와 전혀 반응하지 않고 AFG1에만 특이적으로 결합하여 A26 및 A34와 비교하여 현저하게 낮은 농도로 AFG1이 포함된 시료에서도 AFG1의 검출이 가능함을 확인하였는바, 본 발명의 변형된 GO-SELEX 방법으로 개발된 서열번호 1 내지 7의 염기서열을 갖는 AFG1-1 내지 AFG1-7의 앵타머는 AFG1에 대한 높은 특이도와 민감도 및 결합력을 갖는 앵타머로서 AFG1의 검출에 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "앵타머"란 특정 물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA(ssDNA) 또는 RNA이다. 기존에 개발되어 있는 항체를 이용한 방법은 생체의 면역시스템을 이용하여 만들어지기 때문에 비교적 많은 시간이 들고 고비용이라는 점, 단백질이기 때문에 그 안정성이 문제가 되는 경우가 있는 반면, 앵타머는 합성에 있어서, 비교적 단순한 방법으로 가능하고 세포, 단백질 그리고 작은 유기물질까지도 표적물질이 될 수 있기 때문에 이를 이용한 새로운 검출방법들의 개발이 가능하며 그 특이성 및 안정성이 이미 개발되어 있는 항체에 비해 매우 높은 점에 착안하여, AFG1 단백질의 특이적 검출을 위하여 DNA 앵타머를 사용하였다. 상기 앵타머는 바람직하게는 서열번호 1~7 중 어느 하나의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 앵타머는 또한 이 기술분야에서의 자체 공지의 방법에 의해 화학 합성할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 앵타머는 AFG1에 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, 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.
- [0047] 본 발명의 앵타머는 또한 AFG1에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 변형(예, 화학적 치환)된 것이어도 좋다. 이러한 변형으로서, 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.
- [0048] 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.

[0049] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.

[0050] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일(Myristoyl), 리췌콜릭-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.

[0051] 본 발명은 또한, 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 AFG1 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0052] 본 발명의 AFG1 조성물은 대표적인 진균독인 AFG1을 검출하기 위한 것으로, AFG1은 인간 및 축산동물이 섭취하는 식품 내에 존재하므로 섭취하였을 때 각종 질병을 일으킬 가능성이 높다. 식품 내 AFG1검출 및 그 농도를 측정하는 기술이 필요하다. 따라서, AFG1의 검출을 위해 본 발명의 DNA 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 DNA 앵타머를 자성비드에 고정화시켜 AFG1을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-AFG1 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 AFG1을 분리함으로써 AFG1 만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.

[0053] 본 발명의 조성물을 이용하는 AFG1의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 DNA 앵타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 AFG1을 포함하는 시료를 통과시켜 AFG1 만을 선택적으로 제거할 수 있다.

[0054] 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., 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]. 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 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.

[0055] 기존의 Aflatoxin 검출방법은 주요 면역화학 기반 분석법인 ELISA가 있으며 크로마토그래피, UV-흡수, 분광광도법, 형광 및 면역 화학 분석 시험과 같은 전기화학 및 광학원리를 이용한 방법이 있다. 그러나 기존의 방법은 장비가 잘 갖추어 진 실험실, 숙련된 전문가를 필요로 하며 유해 용매를 다루고 검출하는데 상당한 시간이 소요된다는 단점이 있다.

[0056] 이에, 본 발명은 상기 DNA 앵타머를 이용하여 금 나노입자 기반의 색도 분석으로 AFG1의 검출방법을 제공한다. 구체적으로, 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 AFG1을 검출할 수 있다

[0058] 본 발명은 또 다른 관점에서 앵타머를 이용한 AFG1의 검출방법에 관한 것이다. 상기 AFG1은 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.

[0059] 본 발명의 다른 실시 예에서는 상기 서열번호 1 내지 7로 표시되는 핵산 앵타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 2, 3으로 표시되는 핵산서열인 앵타머 AFG1-2, AFG1-3에 대하여 금 나노입자 기반 색도 분석을 수행한

결과, AFG1에 특이적으로 결합함을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 상기 AFG1에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 AFG1의 검출센서에 관한 것이다.

[0060] 상기 AFG1에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 검출 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. AFG1 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.

[0061] 본 발명에 따른 AFG1에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, AFG1만을 특이적으로 검출하는 바, 이를 포함하여 AFG1의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.

[0062] 본 발명은 또 다른 관점에서, AFG1에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 AFG1의 제거방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1 내지 7의 AFG1에 특이적인 앵타머를 고상 담체에 고정화하고 상기 고상 담체와 AFG1의 제거가 필요한 시료를 접촉시키는 단계를 포함하는 AFG1의 제거방법을 제공할 수 있다. AFG1 앵타머가 고정되는 고상 담체는 기판, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 비드, 컬럼, 및 다공질체의 담체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 기판은 니켈-PTFE(폴리테트라플루오로에틸렌) 기판, 유리 기판, 아파타이트(apatite) 기판, 실리콘 기판, 금 기판, 은 기판 또는 알루미늄 기판일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명의 AFG1 제거방법은 그 목적 달성을 위하여 바람직하게는 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 앵타머가 고정된 필터 또는 비드에 AFG1이 포함된 시료를 통과시키는 단계를 포함하여 수행될 수 있고, 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 AFG1가 포함된 시료를 통과시켜 AFG1를 제거할 수 있다.

[0064] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 시료를 접촉시킨 고상 담체를 수득하여 AFG1을 분리하는 단계를 포함하는 AFG1 분리방법을 제공할 수 있다.

[0066] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0068] [실시예]

[0069] 실시예 1: ssDNA(single strand DNA)라이브러리의 제조

[0070] 양 말단에 PCR 증폭을 위한 프라이머 결합서열을 갖고, 중앙에 무작위 DNA 염기서열을 포함하는 랜덤 DNA 라이브러리(5'-AGCAGCACAGAGGTCAGA -random region- TATGCGTGCTACCGTGAA-3')를 설계하였다.

[0071] 본 발명에 사용된 모든 올리고뉴클레오티드는 Genotech Inc. Korea에 화학적으로 합성을 의뢰하여 사용하였다.

[0073] forward primer (서열번호 8): AGCAGCACAGAGGTCAGA

[0074] reverse primer (서열번호 9): TATGCGTGCTACCGTGAA

[0076] 실시예 2: 변형된 GO-SELEX를 이용한 AFG1 특이적 앵타머 탐색

[0077] AFG1과 그래핀 옥사이드 용액을 버퍼용액(20mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM

KCl, 1mM CaCl₂)에 넣고 혼합하여 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 이때 그래핀 옥사이드에 결합하지 않은 AFG1은 원심분리를 통해 제거하였다. 상기 실시예 1에서 합성된 랜덤 DNA pool을 AFG1과 그래핀 옥사이드가 결합되어 있는 용액에 첨가하고 30분동안 상온에서 반응시켰다. AFG1과 결합하지 않은 단일 가닥 DNA는 원심분리를 통해 제거하였다. 이어서 AFG1에 특이적으로 결합하는 DNA를 확보하기 위해 AFG1을 추가적으로 혼합 용액에 첨가하고 30분동안 상온에서 반응시켰다. 이렇게 추가적으로 첨가된 AFG1이 그래핀 옥사이드 표면의 AFG1과 단일 가닥 DNA 사이의 결합을 이겨내면서 그래핀 옥사이드 표면으로부터 단일 가닥 DNA를 떼어낸다. 이후 원심분리 결과 상층액의 에탄올 침전을 통해 AFG1 특이적 단일 가닥 DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 AFG1특이적 DNA의 초기에 넣어 준 랜덤 DNA pool 내 비율을 측정하여 도 3에 나타내었다. 도 3에서 확인되는 바와 같이 각 선별단계(selection round)에서 얻어진 AFG1에 특이적으로 결합하는 DNA의 비율이 증가하고 있음을 알 수 있다.

[0079] 실시예 3: AFG1에 대한 친화력이 강화된 DNA 앵타머 pool의 제조

[0080] Aflatoxin G1 (AFG1)과 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0081] PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0082] forward (APTFf) 5'-fluorescein- AGCAGCACAGAGGTCAGA -3': 서열번호 8

[0083] reverse (APTR) 5'- TATGCGTGCTACCGTGAA -3': 서열번호 9

[0085] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중 가닥의 DNA를 단일 가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드젤 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. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 AFG1과 그래핀 옥사이드가 녹아 있는 버퍼용액과 혼합하여 새로운 선별과정을 시작하였다. 이러한 과정의 모식도를 도 2에 나타내었고, 일련의 과정(SELEX process)을 한 번의 선별 (selection)이라 하면 총 8번의 선별과정을 거쳐 Aflatoxin G1 (AFG1)에 결합하는 DNA pool을 얻었다. 5번째 선별과정부터는 카운터 타겟(Aflatoxin B1, Aflatoxin B2)을 추가로 이용했다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Qiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고, 얻어진 콜로니로부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한 결과, 서로 다른 7종의 Aflatoxin G1 (AFG1)에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 확보하였다.

[0087] 실시예 4: 7종의 DNA 앵타머의 염기서열 및 구조 분석

[0088] 서로 다른 7종의 Aflatoxin G1 (AFG1)에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1에 제시하였다. 또한, 이 7종의 AFG1 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 4-10에 나타내었다.

표 1

[0089]

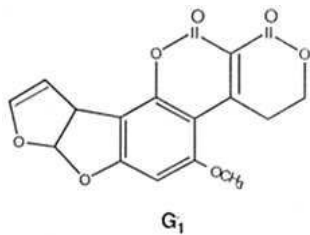
서열번호	앵타머	염기서열 (5'-3')
1	AGF1-1	AGCAGCACAGAGGTCAGATGAAAAATGTACCCATTGGGTAGTCACGCGTGTGTTGGGGTCCTATGCGTGCTACCGTGAA
2	AFG1-2	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGCGACCACACATGCGCGGGGCTACTCGCTGGGCTGGTTGCCTATGCGTGCTACCGTGAA
3	AFG1-3	AGCAGCACAGAGGTCAGATGACCACACACGTTGGACCACCCCTATGCGTGCTACCGTGAA
4	AGF1-4	AGCAGCACAGAGGTCAGAGCTTGTATAGGTTGTATGCGTGCTACCGTGAA
5	AGF1-5	AGCAGCACAGAGGTCAGATGAAAACCTACTTAGGGCTCTGCCTATGCGTGCTACCGTGAA
6	AGF1-6	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGCGACCCACATGCGCGGGGCTACTCGCTGGGCTGGTTGCCTATGCGTGCTACCGTGAA
7	AGF1-7	AGCAGCACAGAGGTCAGAGGTAAGAGTGGATATGCGTGCTACCGTGAA

[0090] 실시예 5. DNA 앵타머의 Aflatoxin G1 (AFG1) 와의 결합특이성 확인

[0091] DNA 앵타머가 바이오센서로 사용되기 위해서는, 표적 AFG1 외에 샘플 내의 다른 여러 단백질과 반응을 하지 않는 결합특이성이 중요한바, DNA 앵타머가 선택적으로 결합하는지 여부를 확인하기 위하여, 카운터 타겟(AFB1, AFB2)를 이용하여 상기 실시예 4에서 확보한 7종 앵타머의 AFG1에 대한 결합특이성을 확인하였다.

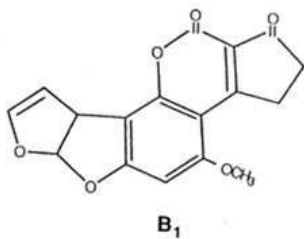
[0092] 구체적으로 2.2nM의 금 나노입자를 1uM의 앵타머와 상온에서 30분간 흡착 반응을 시킨 후 20nM의 Aflatoxin G1 (AFG1)[화학식1]을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 위의 방식으로 카운터 타겟(Aflatoxin B1[화학식2], Aflatoxin B2[화학식3])에 대해서도 반응시켰다. 상기 용액에 1M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정함으로써, 앵타머와 Aflatoxin G1 (AFG1)와의 결합력이 가장 높은 앵타머 AFG1-2, AFG2-3을 선정하였다. UV 흡광도 그래프와 반응 후의 샘플의 사진을 도 11, 도 13에 제시하였다.

[0093] [화학식 1]



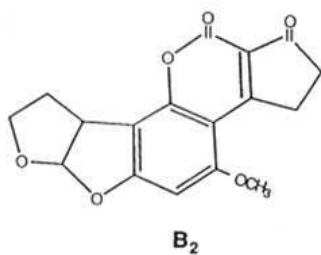
[0094]

[0095] [화학식 2]



[0096]

[0097] [화학식 3]



[0098]

[0100] 실시예 6: DNA 앵타머의 Aflatoxin G1 (AFG1) 와의 결합력 확인

[0101] Aflatoxin G1 (AFG1)에 특이적으로 결합하는 7종의 앵타머 중에서 특이도가 높은 앵타머인 AFG1-2, AFG1-3과 다양한 농도의 AFG1과의 결합을 분석하였다.

[0102] 2.2nM의 금 나노입자를 1uM의 앵타머와 상온에서 30분간 흡착 반응을 시킨 후 다양한 농도의 Aflatoxin G1 (AFG1)을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 상기 용액에 1M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정하였다. UV 흡광도 그래프와 반응 후의 샘플의 사진을 도 12, 도 14에 제시하였다. 이로 보아 Aflatoxin G1 (AFG1) 결합 특이적인 앵타머와 금 나노입자를 이용하여 Aflatoxin G1 (AFG1)을 검출할 수 있는 것을 증명하였다.

[0104] 실시예 7: 공지의 AFG1 결합 앵타머와 특이도 및 민감도 비교

[0105] AFG1과 결합력을 갖는 것으로 알려진 앵타머 A34 및 A20(CN 201710347248.9 참조)과 상기 실시예 4-6을 통해 선별된 앵타머 AFG1-3을 이용하여 AFG1의 검출 민감도와 특이도를 비교확인하였다. 비교대상 앵타머 A34 및 20의 서열은 아래 표 2와 같다.

표 2

[0106]

서열번호	앵타머	염기서열 (5'-3')
10	A34	5'-TGGGCACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCTCGTGCCCT-3'
11	A26	5'-CACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTG-3'

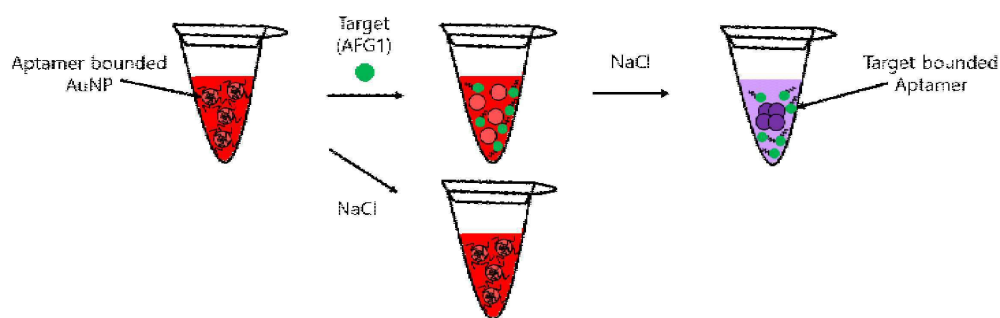
[0107] 구체적으로, 2.2nM의 금 나노입자를 1μM의 앵타머와 상온에서 30분간 흡착 반응을 시킨 후 다양한 농도의 Aflatoxin G1 (AFG1)을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 상기 용액에 1M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정하였다(도 15). 그 결과 AFG1-3은 공지의 앵타머인 A34 및 A26 보다 현저하게 낮은 농도에서도 AFG1의 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

[0108] 이어서, 2.2nM의 금 나노입자를 1μM의 AFG1-3과 상온에서 30분간 흡착 반응을 시킨 후 20nM의 Aflatoxin G1을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 위의 방식으로 Aflatoxin B1(ABF1) 및 Aflatoxin B2(ABF2)에 대해서도 반응시켰다. 상기 용액에 1M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정하였다(도 16). 그 결과, A26 및 A34은 ABF1과 ABF2에도 반응하지만 AFG1-3은 AFG1에만 특이적으로 반응하는 것을 알 수 있었다.

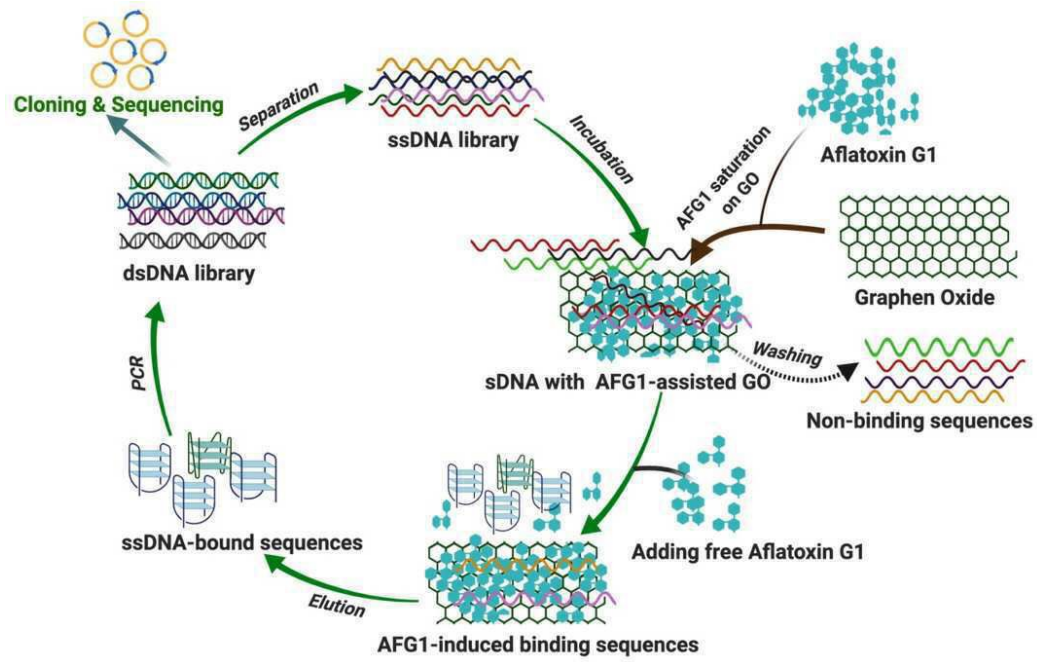
[0110] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

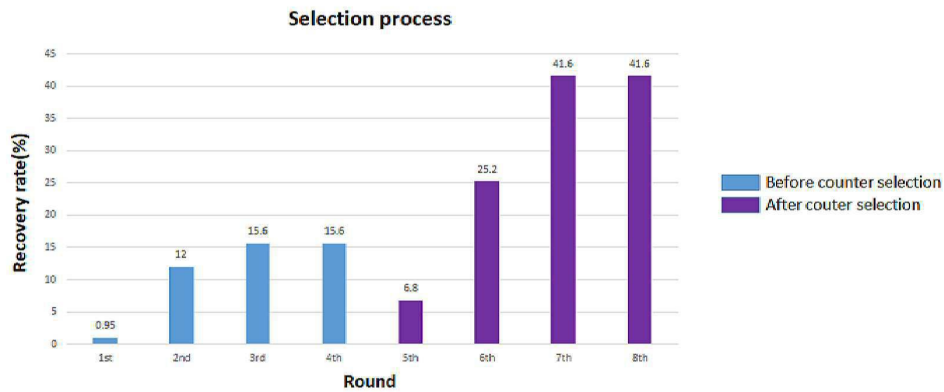
도면1



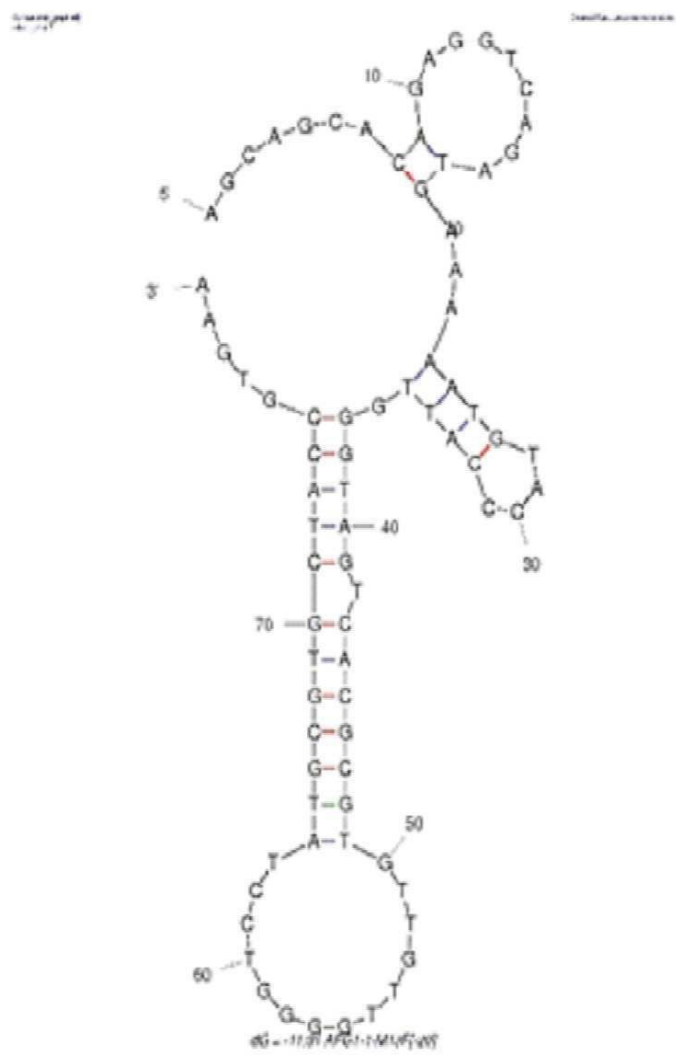
도면2



도면3

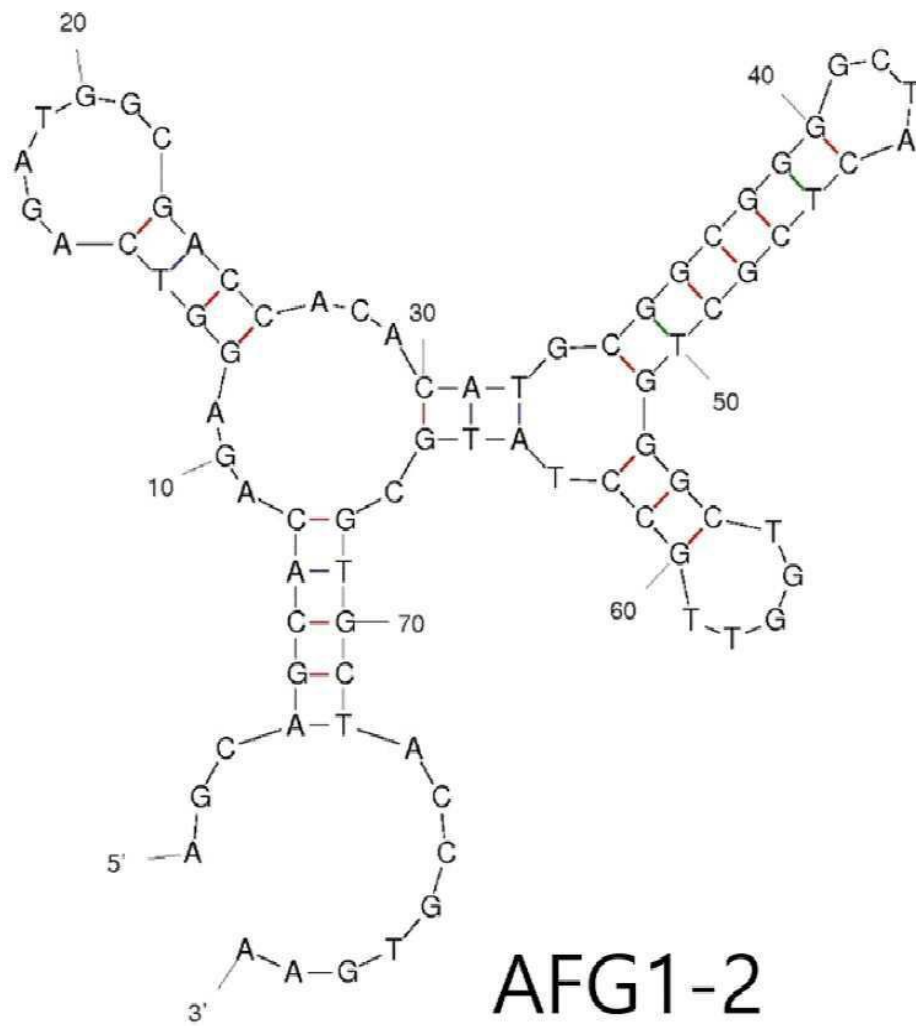


도면4



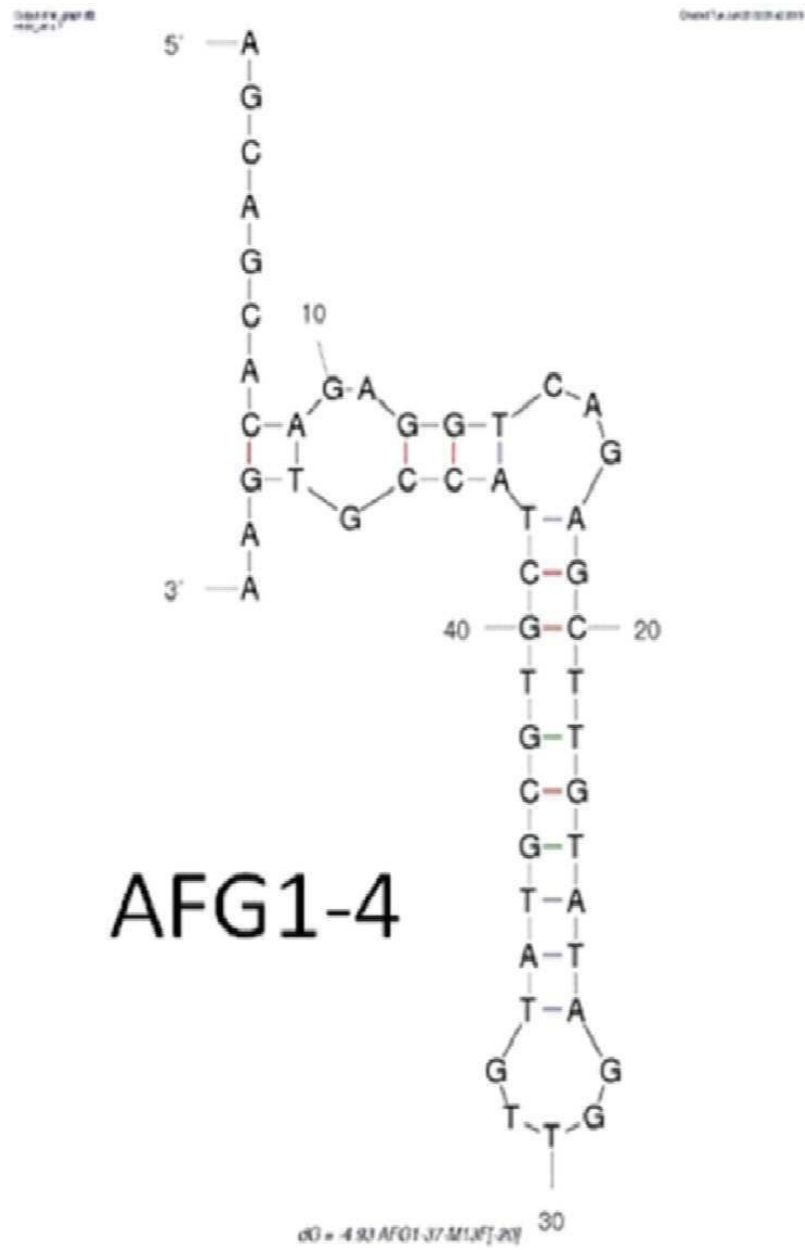
AFG1-1

도면5

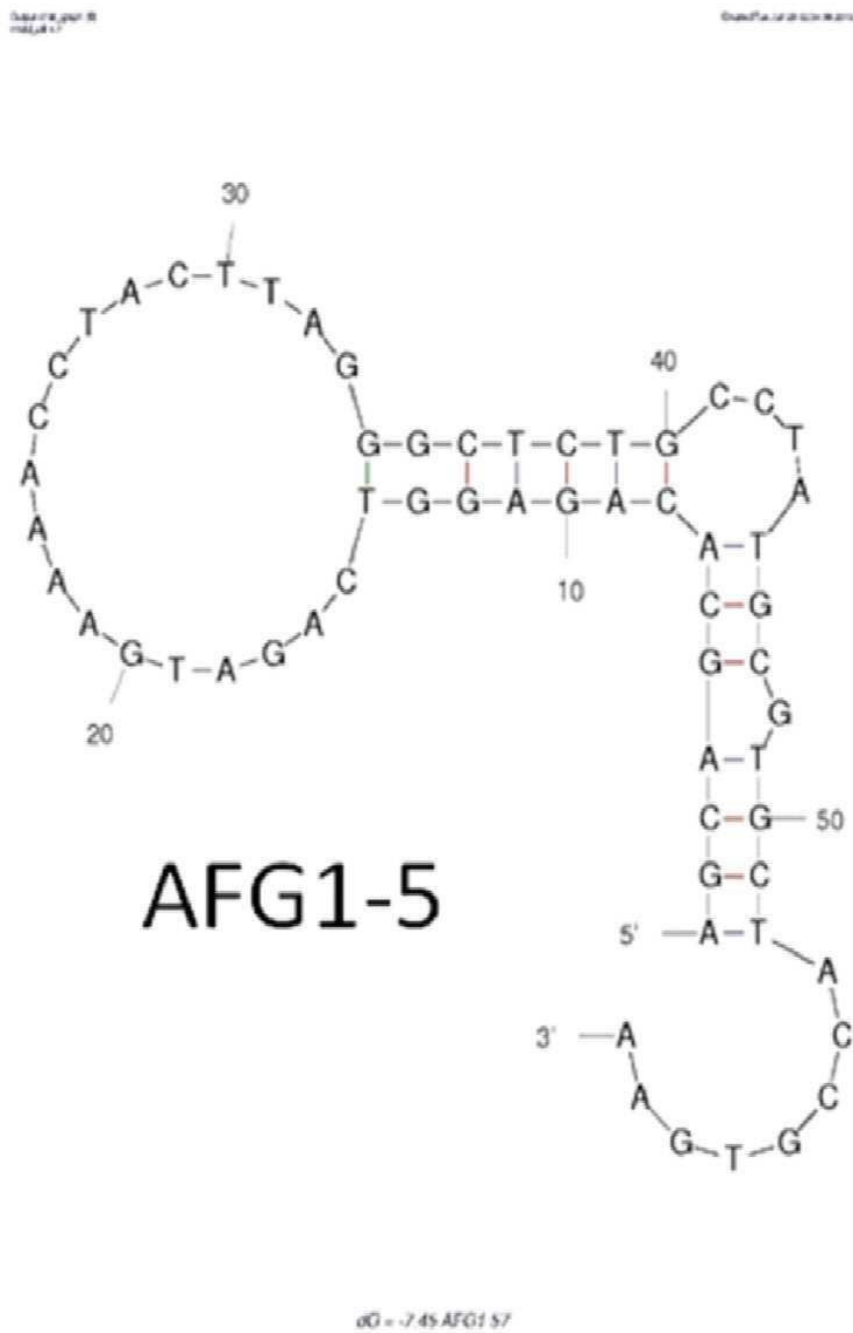


$$dG = -12.95 \text{ AFG1-2-M13F}[-20]$$

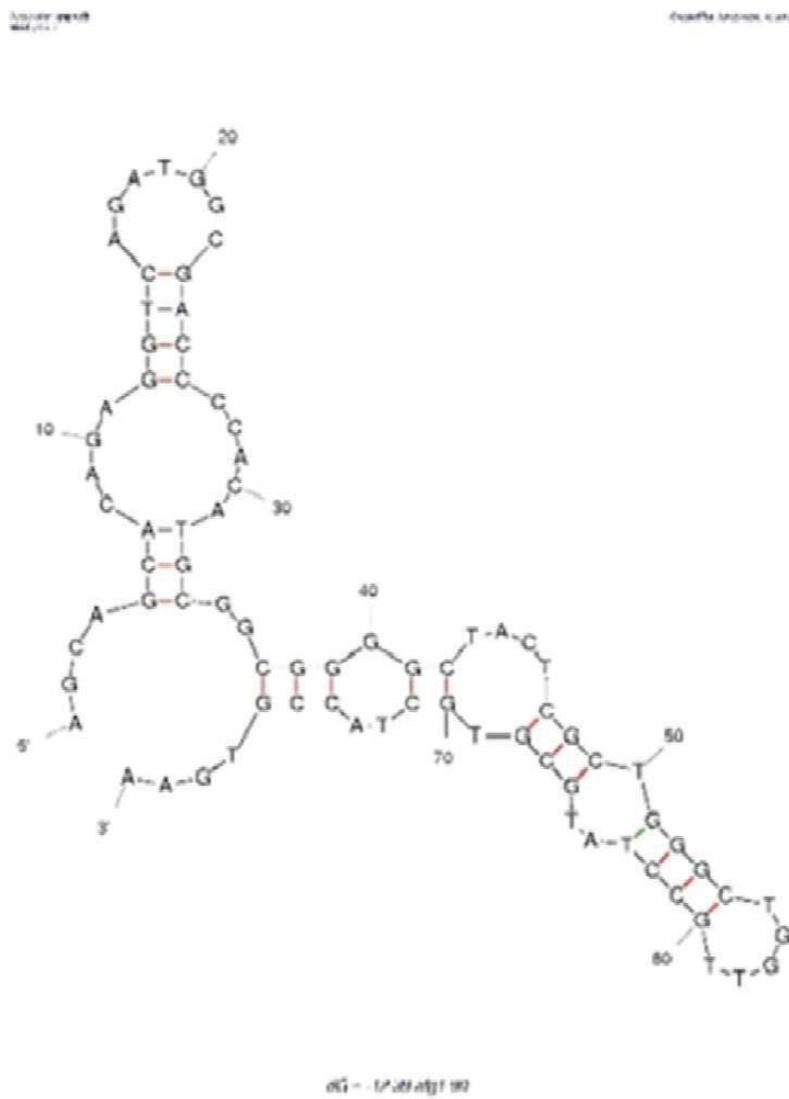
도면7



도면8

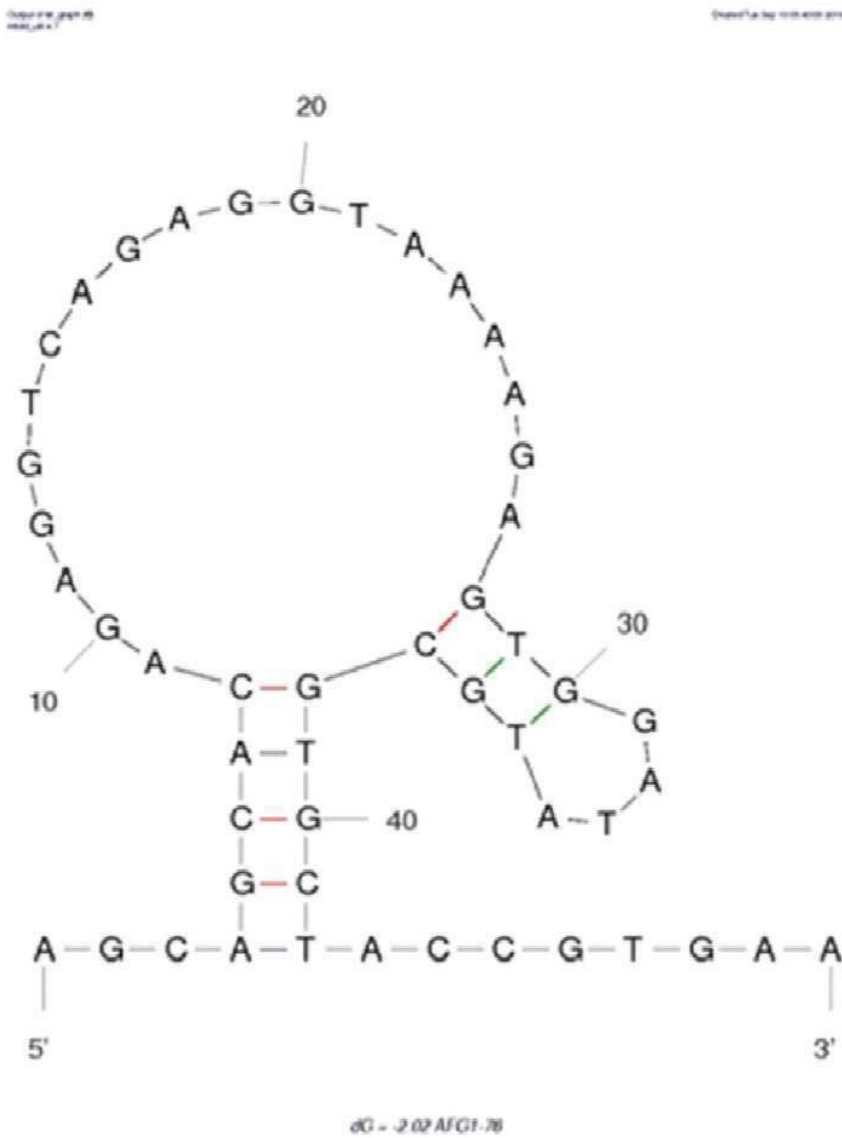


도면9



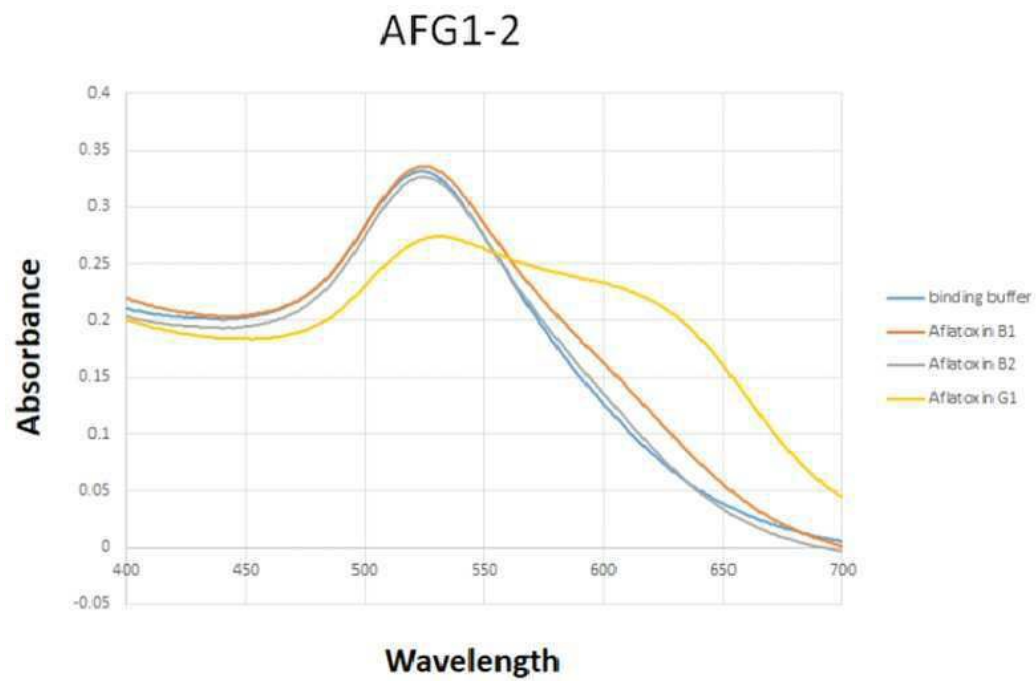
AFG1-6

도면10

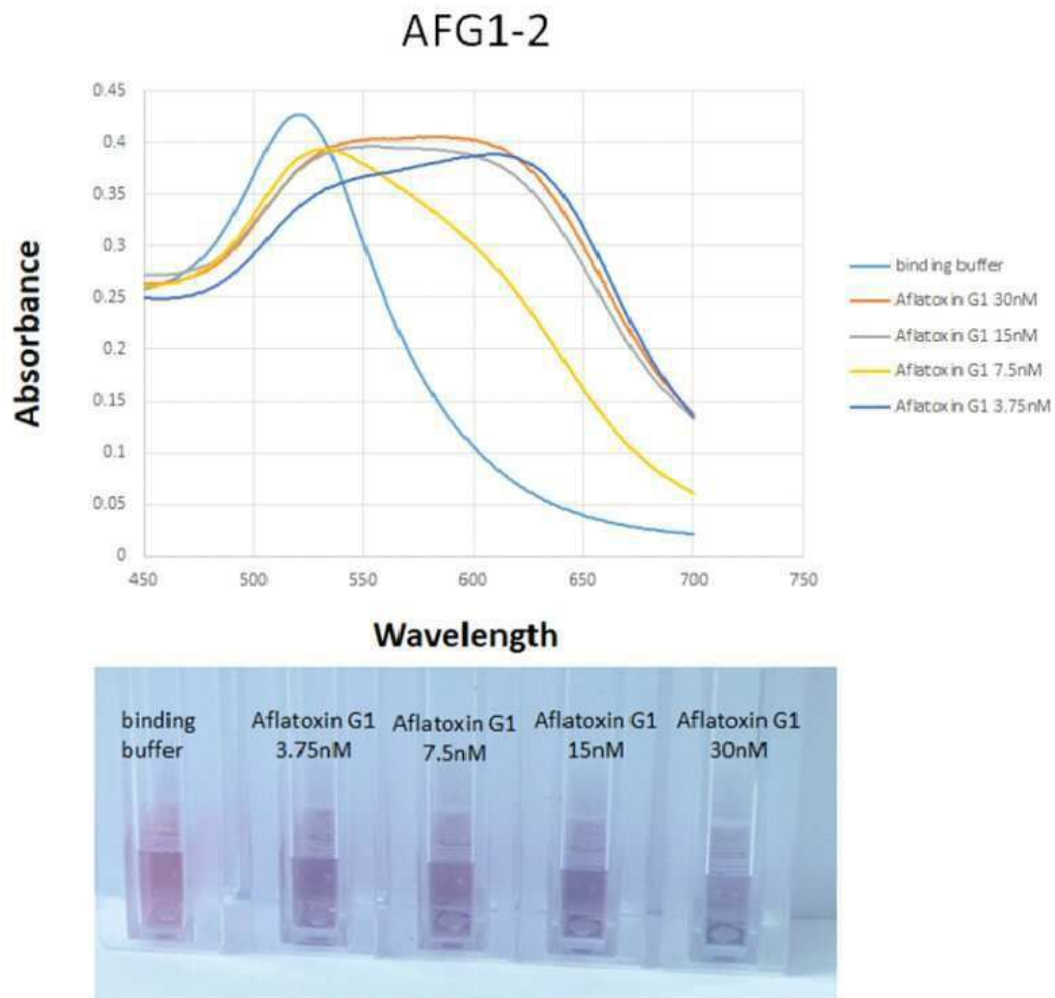


AFG1-7

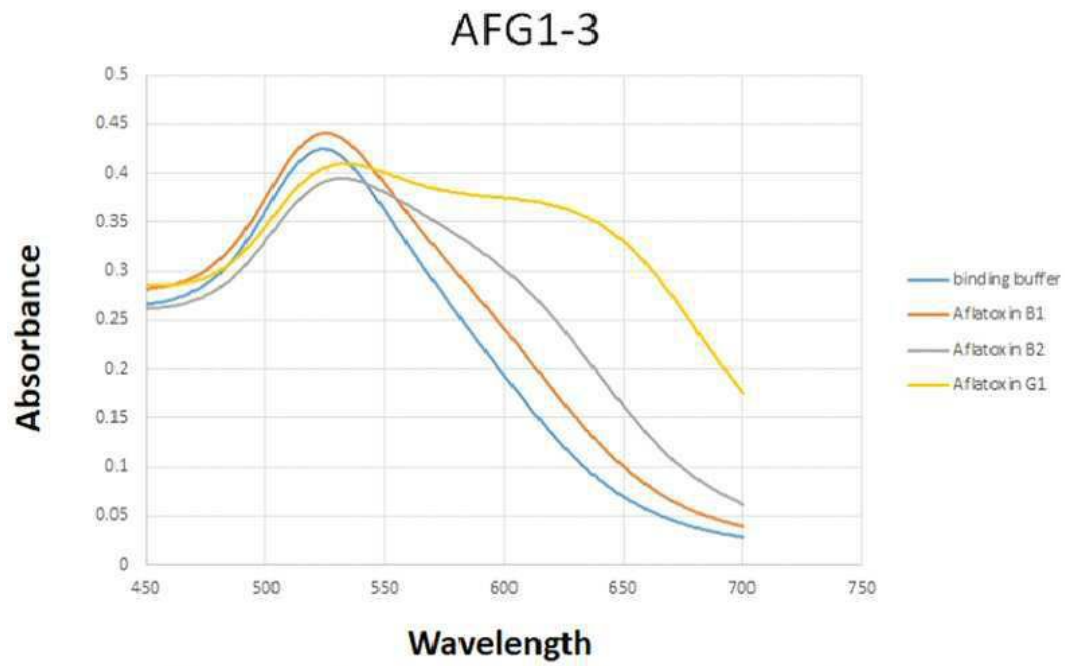
도면11



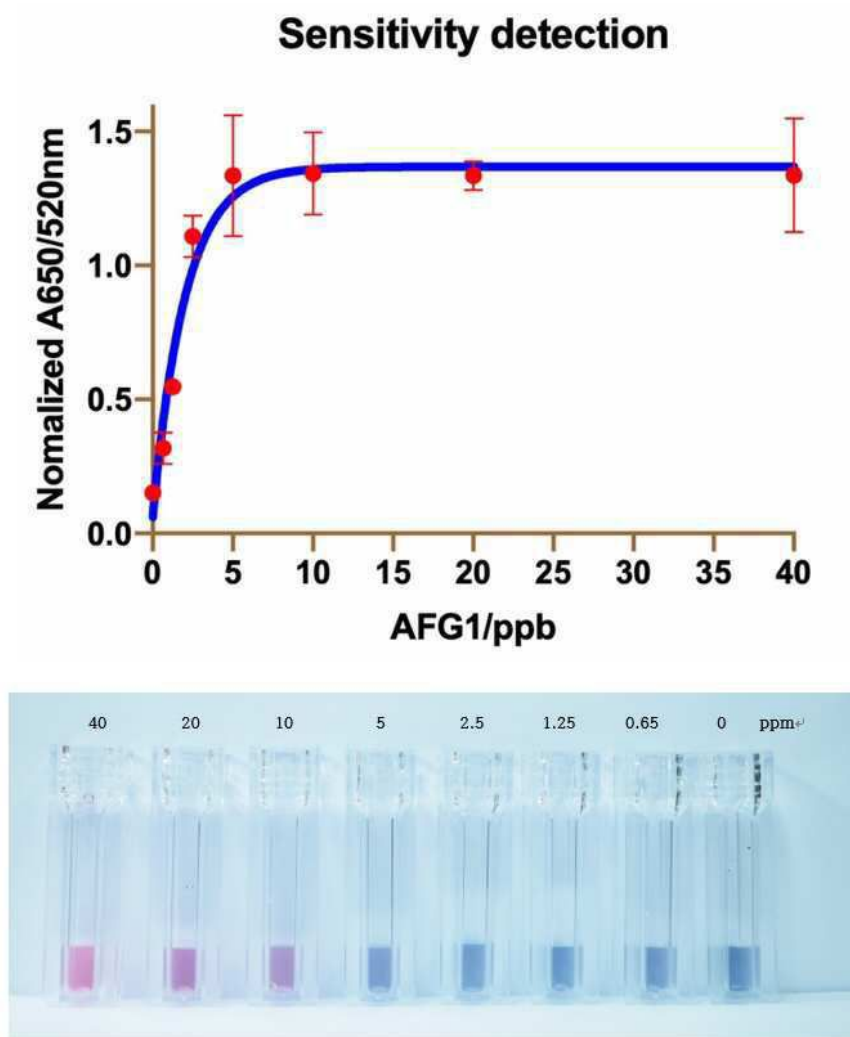
도면12



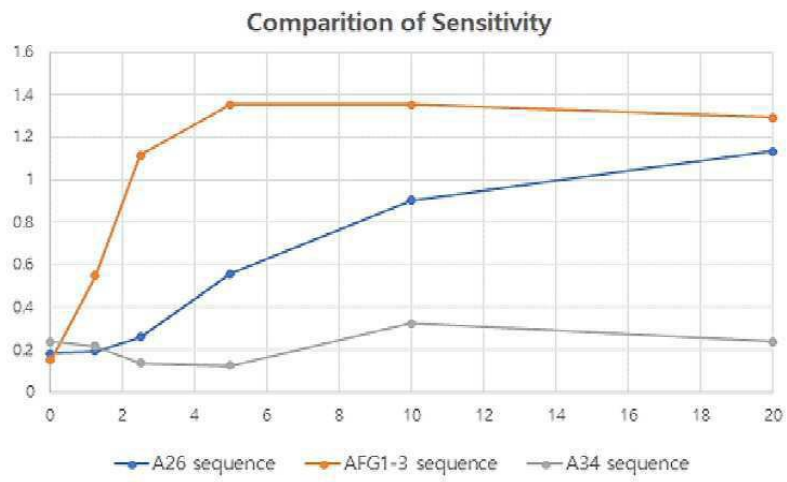
도면13



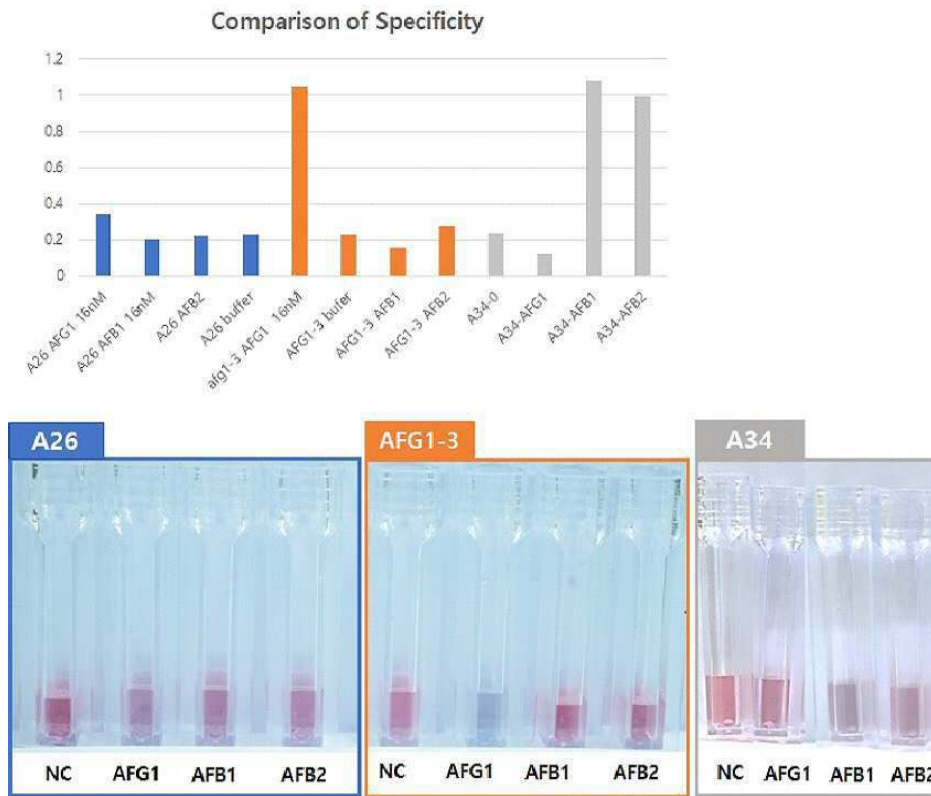
도면14



도면15



도면16



서열 목록

- <110> Korea University Research and Buisness Foundation
- <120> DNA aptamer specifically binding to Aflatoxin G1 and use thereof
- <130> DHP20-519
- <160> 11
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> AGF1-1
- <400> 1
- agcagcacag aggtcagatg aaaaatgtac ccattgggta gtcacgcgtg ttgttggggt 60
- cctatgcgtg ctaccgtgaa 80
- <210> 2
- <211> 80
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AGF1-2

<400> 2

agcagcacag aggtcagatg gcgaccacac atgcggcggg gctactcgct gggctggttg 60

cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AGF1-3

<400> 3

agcagcacag aggtcagatg accacacacg ttggaccacc cctatgcgtg ctaccgtgaa 60

60

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AGF1-4

<400> 4

agcagcacag aggtcagagc ttgtataggt tgtatgcgtg ctaccgtgaa 50

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AGF1-5

<400> 5

agcagcacag aggtcagatg aaaacctact tagggctctg cctatgcgtg ctaccgtgaa 60

60

<210> 6

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AGF1-6

<400> 6
agcagcacag aggtcagatg gcgacccac atgcggcggg gctactcgct gggctggttg 60

cctatgcgtg ctaccgtgaa 80
<210> 7
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> AGF1-7
<400> 7
agcagcacag aggtcagagg taaaagagtg gatatgcgtg ctaccgtgaa 50
<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer_F
<400> 8
agcagcacag aggtcaga 18
<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> primer_R
<400> 9
tatgcgtgct accgtgaa 18
<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> aptamer_A34
<400> 10
tgggcacgtg ttgtctctct gtgtctctcg tgcctt 36
<210> 11
<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer_A26

<400> 11

cacgtgttgt ctctctgtgt ctcgtg

26