



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0096031
(43) 공개일자 2019년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) *G01N 33/543* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
G01N 33/54313 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0015460
(22) 출원일자 2018년02월08일
심사청구일자 2019년01월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
구만복
서울특별시 서초구 신반포로19길 10, 22동 1209호 (반포동, 신반포3지구아파트)
김상훈
서울특별시 성북구 인촌로 38-1, 306호 (안암동2가, 조은오피스텔)
조항석
경기도 광주시 텃골길 63-11, 108동 301호 (중대동, 오페라하우스)
(74) 대리인
이처영, 장제환

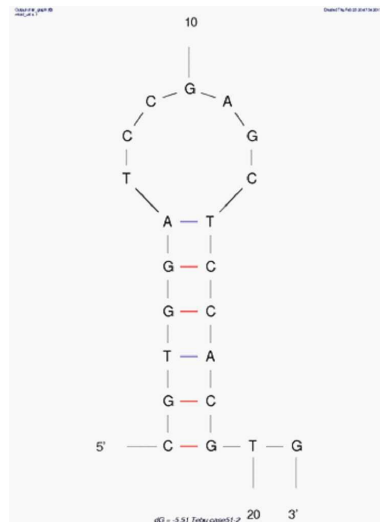
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos))에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos))에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 검출용 핵산 앵타머, 이를 포함하는 타겟의 검출방법, 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트는 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 앵타머의 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 대한 높은 특이성과 결합력을 바탕으로 시료 내 존재하는 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 검출에 유용하다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

G01N 33/54366 (2013.01)

C12N 2310/16 (2013.01)

G01N 2430/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711048706

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 나노·소재기술개발

연구과제명 식품유해물질 검출을 위한 고감도 나노바이오리포터 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 9, 25, 27, 29, 31, 32 및 34 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)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 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)의 검출방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 시료는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동식물 장내 및 동식물 조직으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)의 검출방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 검출은 금 나노입자 기반의 색도 분석으로 검출하는 것을 특징으로 하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)의 검출 방법.

청구항 5

제1항의 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 고상 담체는 기관, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 및 다공재질인 고상 담체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 기관은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관, 유리 기관, 아파타이트 (apatite) 기관, 실리콘 기관, 금 기관, 은 기관 그래픽 옥사이드 기관 및 알루미나 기관으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 8

제1항의 핵산 앵타머 또는 제5항의 복합체를 포함하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos) 검출용 조성물.

청구항 9

제1항의 핵산 앵타머 또는 제5항의 복합체를 포함하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos) 검출용 센서.

청구항 10

제1항의 핵산 앵타머 또는 제7항의 복합체를 포함하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos) 검출용 키트.

청구항 11

제1항의 핵산 앵타머를 이용하는 것을 특징으로 하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)의 분리방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 핵산 앵타머가 고정된 비드가 충전된 컬럼에 시료를 통과시키는 단계를 포함하는 것임을 특징으로 하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)의 분리방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)에 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 특이적으로 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 이를 이용한 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 검출 및 제거방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 테부코나졸(Tebuconazole)은 고추의 탄저병을 예방하기 위해 광범위하게 사용되는 트리아졸(triazole) 유도체이다. 미국 FDA에서는 이 살균제가 사람에게는 안전하다고 여기고 있지만 미국 환경보호국(EPA)에서는 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스를 C등급(발암물질일 가능성이 있는)의 발암물질로 규정하고 있고 스웨덴 화학 협회에서는 잠재적인 내분비 교란 화학물질로 규정하는 등 테부코나졸은 여전히 위험성을 가지고 있다. 최근에는 대형 식품회사의 고춧가루에서 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스가 기준량 이상 초과 검출 되어 유통 및 판매 금지 조치가 내려진 바 있다.

[0004] 이나벤파이드(Inabenfide)는 식물생장억제제로서 장기간의 섭취가 금지되고 있으며 피부나 눈, 또는 흡입을 피하라고 권장하고 있다. 그러나 매우 광범위하게 사용되고 있으며 그로 인해 환경오염이 야기될 수 있다는 문제가 있다.

[0005] 이프로벤포스(Iprobenfos)는 주로 벼 도열병에 사용되는 유기인 살균, 살충제로서 상대적으로 낮은 독성을 가지고 있기 때문에 가장 많이 사용하고 있는 농약들이다. 현재 광범위한 사용량으로 인하여 채소를 비롯한 농수산물에 잔류할 가능성이 높아 빠른 검출을 요하고 있다. 더 나아가 급성 중독될 시 인간에게 영향을 끼칠 수 있으며 이는 메스꺼움, 구토, 인두통, 복통과 심한 설사, 구토에 의한 탈수성 쇼크, 대사성 산성증(Acidosis), 혈압 저하, 췌노 등으로 나타난다. 상기 테부코나졸, 메페나셋, 이나벤파이드 등의 물질이 잔류되어 있는 농축수산물을 장기간 섭취할 경우에는 내장기능 이상, DNA 손상, 신경계와 발달에 해독을 끼치며 암, 기형아 출산, 유산

등이 일어날 수 있다.

- [0006] 따라서 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 오남용을 방지하는 것은 물론이고 식품의 안전성을 확보하기 위하여 토양, 수질, 농수산물에 잔류되어 있는 농약을 검출해 내는 방법을 개발하는 것이 필요한 실정이다.
- [0007] 그러나 기존의 잔류 농약 검출방법은 잔류 농약이 녹아있는 성분에 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 표적 샘플의 손실이 있을 수도 있으므로 정확한 정량이 어렵다. 특히 상수원 및 하천, 약수 등으로 이용되는 수질 자원에 존재하는 농약의 분석이 중요한데, 기존의 검출방법은 주로 기기분석에 기대고 있기 때문에, 현장 분석이 거의 불가능하며, 분석 비용이 비싼 단점이 있다.
- [0008] 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 인체 유래물 내 극미량의 타겟 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 농도 측정에 매우 적절한 물질이며, 이를 활용한 나노 바이오 기술을 통해 치주염 관련 질환과 연관된 특정 단백질을 검출하는데도 응용할 수 있다.
- [0009] 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 증폭속 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.
- [0010] 그래핀 SELEX를 이용하여, 테부코나졸을 검출하는 앵타머가 개발된 바 있다(대한민국 특허 제10-1617205호, YT Nguyen et al., Chemical Communications, Vol. 50, Issue 72, pp. 10513-10516, 2014). 그러나, SELEX 앵타머 개발방법은 PCR을 위한 프라이머 및 임의의 랜덤서열(random sequence)이 필수적이기 때문에 비결합 부분(non-binding region)을 가지는 앵타머가 생산되는 단점이 있다. 즉, 제작한 앵타머의 일부 서열만이 타겟과 결합하고, 그 외 나머지는 결합에 불필요한 부분인 것이다. 이러한 결합에 불필요한 부분은 타겟과의 결합체 구조 형성에 관여하지 않아, 타겟과 앵타머 간의 결합 저해 요소가 된다.
- [0011] 이를 개선하기 위하여, 앵타머의 구조적 특징을 살펴 잘린(truncated or shorten) 앵타머를 개발할 경우, 종래 앵타머 염기서열에서 일부를 제외하여 타겟과 결합에 필요한 염기서열만을 남겨 타겟과의 친화도를 높이는 시도가 진행되고 있다. 일례로, 대한민국 특허 제10-0961532호에서는 테트라사이클린 및 그 유도체에 특이적으로 결합하는 21종의 단일가닥 핵산 구조체 앵타머를 개발하였으며, 대한민국 특허 제10-1342710호에서는 상기 21종의 단일가닥 핵산 구조체 앵타머의 염기서열을 최소화 하여 종래의 앵타머보다 1000배 이상의 친화도를 가지는 앵타머를 개발한 바 있다.
- [0012] 한편, 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[Zhao, W., Brook, M.A., Li, Y., 2008a. ChemBioChem 9, 2363-2371]. 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 앵타머과 타겟과의 결합으로 인해 금 나노입자의 표면에서 떨어져 나오는 현상에 의해 색이 변하는 특징을 이용하는 것이다. 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 ioelectronics, 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 있는 것이다. 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. 이러한 원리를 통해 금 나노입자를 이용하여 핵산 앵타머의 타겟 결합 친화도를 분석할 수 있다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 기존의 핵산 앵타머보다 높은 친화도로 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)에 결합하는 앵타머를 개발하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 금 나노입자 색도기반 스크리닝 방법을 통해 개발하였다. 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 조성물을 이용하면, 식품 등에 잔류하는 미량의 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)를 효과적으로 검출 또는 제거할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0015] 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

[0017] 본 발명의 목적은 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)를 특이적으로 검출할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 9, 25, 27, 29, 31, 32 및 34 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머를 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 이용한 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 검출방법을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 이용한 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 제거방법을 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머 또는 상기 복합체를 포함하는 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 검출용 조성물, 센서, 및 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따르면 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하여 시료 내 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)를 보다 간편하게 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 검출 방법 및 장치에 이용하여 극소량의 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스가 포함되어 있는 시료에서 타겟을 선택적으로 측정할 수 있다. 따라서, 샘플 내에 존재하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos) 농도를 쉽고 빠르게 측정함으로써 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos) 검출 및 분리에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 앵타머 및 염 유도 금 나노입자 응집현상을 이용하여 타겟물질을 검출하는 원리를 설명하는 개략도이다.
- 도 2는 서열번호 1로 표시되는 테부코나졸(Tebuconazole)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머의 2차 구조이며, 자른(truncation)위치를 표시한 것이다.
- 도 3은 자른(truncation) 핵산 앵타머 후보군 34종의 서열정보이다.
- 도 4는 34개 앵타머 후보군에 음성대조군(NC)과 테부코나졸(PC)의 금 나노입자 기반 색도분석에 따른 A650/A520 값을 계산한 결과이다.
- 도 5의 결합력이 높은 앵타머 후보군의 특이성 시험 결과(Specificity test) 그래프이다.
- 도 6은 34개 앵타머 후보군에서 결합력이 가장 뛰어난 C51-2 앵타머의 2차 구조이다.
- 도 7은 C51-2 핵산 앵타머의 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 대한 친화도를 증명하는 ITC 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 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.
- [0030] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 GO-SELEX 프로세스를 통해 선별한 테부코나졸(Tebuconazole)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 특정 부위를 자른(truncation) 다음, 각 후보군의 결합력을 금 나노입자 기반 색도 분석법을 통해 선별하였다. 그 결과, 서열번호 9, 25, 27, 29, 31, 32 및 34의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 상기 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 일 실시예에서는, 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 금 나노입자 기반 색도분석법을 이용하여 선별한 것이다.
- [0031] 본 발명의 “핵산 앵타머”란, 높은 친화성으로 타겟물질을 특이적으로 인지할 수 있는 작은 단일가닥 올리고 핵산을 말한다.
- [0032] 본 발명에서 “시료”란, 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스를 함유하거나 함유하고 있는 것으로 추정되어 분석이 행해질 조성물로, 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.
- [0033] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 9, 25, 27, 29, 31, 32 및 34 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는,

테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머에 관한 것이다.

[0034] 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.

[0035] 앵타머 C17-2: 5' - CGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGGTGGATCCGAGCTCCACGTG 3' (서열번호 9)

[0036] 앵타머 C40-2: 5' - CGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG 3' (서열번호 25)

[0037] 앵타머 C50-2: 5' - GCGTGGATCCGAGCTCCACGTG 3' (서열번호 27)

[0038] 앵타머 C51-2: 5' - CGTGGATCCGAGCTCCACGTG 3' (서열번호 29)

[0039] 앵타머 C52-2: 5' - GTGGATCCGAGCTCCACGTG 3' (서열번호 31)

[0040] 앵타머 C53-1: 5' - CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCG 3' (서열번호 32)

[0041] 앵타머 C57-1: 5' - CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGA 3' (서열번호 34)

[0043] 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 테부코나졸(Tebuconazole), 이나벤파이드(Inabenfide) 및 이프로벤포스(Iprobenfos)의 검출방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동식물 장내 및 동식물 조직으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에 있어서, 상기 금 나노입자 기반 색도 분석으로 검출하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에서 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 타겟을 검출할 수 있다.

[0047] 상기 검출은 또한, 금 칩(gold chip)을 이용한 자기공명분석 SPR (Surface Plasmon Resonance) 장비로 타겟을 검출할 수 있다. 즉, 금 칩 (gold chip)에 앵타머를 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 증가하는 response unit 값을 측정하는 방식을 이용하여 타겟을 검출할 수 있다.

[0048] 상기 검출은 또한, 그래핀옥사이드 기반 FRET 방법으로 타겟을 검출할 수 있다. 즉, 그래핀옥사이드는 소광물질(quencher)로서 FAM이라는 형광물질과 특정 거리 내에 존재할 때 520nm 근처에서 방출하는 FAM의 빛 에너지를 흡수한다. 이러한 현상을 FRET이라고 하며 이 실험은 다음과 같은 원리로 이루어진다. FAM으로 단일 가닥 DNA(본원 발명의 앵타머)의 3' 끝을 표지하고 이를 그래핀옥사이드와 반응시킨다. 그래핀옥사이드는 단일 가닥 DNA(본원 발명의 앵타머)와 $\pi-\pi$ 결합을 통해 비특이적으로 결합하고 이에 의해 FAM의 형광은 그래핀옥사이드에 의해 소광된다. 이 후 시료 내 타겟이 존재할 경우, 단일 가닥 DNA(본원 발명의 앵타머)와 타겟 간의 친화도가 그래핀옥사이드와의 친화도보다 큰 경우에 DNA가 그래핀 옥사이드로부터 떨어져 나와 다시 FAM의 형광이 나타난다. 반면 DNA(본원 발명의 앵타머)와 타겟 사이 친화도가 더 낮은 경우에는 타겟이 그래핀옥사이드에서 DNA를 분리하지 못해 형광은 소광된 상태를 유지한다. 결합력의 차이가 형광의 방출량 차이로 나타나는 이러한 특성을 바탕으로 형광을 측정함으로써 단일 가닥 DNA와 타겟 간의 결합력을 확인할 수 있다.

[0050] 본 발명의 앵타머는 이 기술분야에서 이미 공지된 방법에 의해 화학 합성할 수도 있다.

[0051] 본 발명의 핵산 앵타머는, 타겟에 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).

[0052] 본 발명의 핵산 앵타머는 또한 타겟에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기 (예를 들면, 푸린, 피리미딘)가 변형 (예를 들면, 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-우리실로의 치환을 들 수 있다.

[0053] 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(아미테이트), 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.

[0054] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.

[0055] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오타이드, 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.

[0057] 본 발명은 또 다른 관점에서 본 발명의 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체에 관한 것이다.

[0058] 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.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 기관은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관, 유리 기관, 아파타이트 (apatite) 기관, 실리콘 기관, 금 기관, 은 기관, 그래핀 옥사이드 기관 및 알루미늄 기관으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 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, 그래핀 옥사이드 또는 알루미늄 기관 등으로, 이들의 기관에 폴리머 등의 코팅을 실시한 것을 들 수 있다.

[0061] 상기 수지는 아가로스 (agarose) 입자, 실리카 입자, 아크릴아미드와 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 폴리스티렌 가교 디비닐벤젠 입자, 텍스트란을 에피클로로히드린으로 가교한 입자, 셀룰로오스파이버, 알틸텍스트란과 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 가교폴리머, 단분산계 합성폴리머, 단분산계 친수성폴리머, 세파로오스 (Sephacrose) 또는 토요펄 (Toyopearl) 등을 들 수 있고, 또한 이들의 수지에 각종 관능기를 결합시킨 수지를 사용할 수 있다.

[0062] 상기 고상담체는 타겟의 정제, 타겟 단백질의 검출 또는 정량에 유용할 수 있다.

[0063] 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, 카복실기를 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.

[0064] 앵타머가 고정화된 고상담체를 이용하여 타겟 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 타겟의 수준을 신속하게 측정할 수 있다. 또 다른 방법으로는 자성 비드에

상기 DNA 앵타머를 고정화시켜 타겟을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-타겟 복합체를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 타겟을 분리함으로써 타겟만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.

- [0066] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 포함하는 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0067] 본 발명의 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 검출용 조성물은 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스를 검출하기 위한 것으로, 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 검출을 위해 본 발명의 핵산 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 앵타머를 자성비드에 고정화시켜 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스를 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스를 분리함으로써 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.
- [0068] 본 발명의 조성물을 이용하는 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 핵산 앵타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 타겟을 포함하는 시료를 통과시켜 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스만을 선택적으로 제거할 수 있다.
- [0070] 본 발명은 또한, 상기 타겟에 특이적으로 결합하는 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 함유하는 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 검출센서에 관한 것이다.
- [0071] 상기 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 특이적으로 결합하는 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 함유하는 검출 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 타겟 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.
- [0072] 본 발명에 따른 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.
- [0073] 본 발명은 또 다른 관점에서, 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 특이적으로 결합하는 앵타머 또는 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 이용한 테부코나줄, 이나벤파이드 및 이프로벤포스의 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 타겟이 포함된 시료를 통과시켜 타겟을 제거할 수 있다.
- [0075] 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.
- [0077] **실시예 1: 앵타머 흡착 금 나노입자 색도 분석을 이용한 앵타머 스크리닝**
- [0078] **1.1 비 고정화 방식의 앵타머 흡착 금 나노입자의 제조**
- [0079] 비 고정화 방식 앵타머 흡착 금나노입자를 만드는데 이용하기 위해 시트로산염(citrate)으로 안정화된 금 나노입자를 제조하였다. 큰 비커에 HCL과 HNO₃를 3:1 비율로 섞어서 왕수를 만들어 준비한 뒤, 금 나노입자를 만드는데 사용할 200ml 플라스크와 자석막대를 적어도 15분 이상 담가두어 오염물질을 제거하였다.

[0080] 위와 같이 준비한 플라스크에 3차 증류수를 98 ml 넣고 핫플레이트 위에서 저어주면서(stirring) 50mM HAuCl₄ 용액을 2ml 첨가하여 HAuCl₄의 최종 농도가 1mM이 되도록 하였다. 이 용액이 끓기 시작하면 빠르게 38.8mM의 시트르산나트륨(sodium citrate) 용액을 10ml 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 μm nitrocellulose 필터 페이퍼를 이용하여 여과하여 만드는 과정에서 응집된 금 나노입자 혹은 그 외의 불순물을 제거하였다. 완성된 금나노입자 용액은 4℃에 냉장 보관하였다.

[0082] **1-2: 후보군 앵타머 제작**

[0083] 서열번호 1로 표시되는 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머를 도 2에 표시된 구역으로 ssDNA 서열을 합성하여 서열번호 1로 표시되는 기존의 핵산 앵타머 서열에 대한 truncated 된 핵산 앵타머를 합성하였다.

[0084] 최종적으로 34개의 truncated 핵산 앵타머 후보군으로 제조하였으며, 그 결과는 표 1 및 도 3과 같다.

표 1

핵산 앵타머 서열정보

[0085]

Aptamer candidate	SEQ ID NO.	Size (mer)	Sequence(5' → 3')
Original (T2)	1	76	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C5-1	2	10	CGTACGGAAT
C5-2	3	66	TCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C9-1	4	14	CGTACGGAATTCGC
C9-2	5	62	TAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C13-1	6	18	CGTACGGAATTCGCTAGC
C13-2	7	58	CCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C17-1	8	22	CGTACGGAATTCGCTAGCCCC
C17-2	9	54	CGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C21-1	10	26	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGC
C21-2	11	50	AGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C25-1	12	30	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGC
C25-2	13	46	CACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C29-1	14	34	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACG
C29-2	15	42	GCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C33-1	16	38	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTT
C33-2	17	38	GGGTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C37-1	18	42	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGT
C37-2	19	34	TGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C41-1	20	45	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGG
C41-2	21	31	TCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C45-1	22	49	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCC
C45-2	23	23	ACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C49-1	24	53	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTG
C49-2	25	23	GCGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C50-1	26	54	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGC
C50-2	27	22	GCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C51-1	28	55	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCG
C51-2	29	21	CGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C52-1	30	56	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGC
C52-2	31	20	GTGGATCCGAGCTCCACGTG
C53-1	32	57	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCG
C53-2	33	19	TGGATCCGAGCTCCACGTG
C57-1	34	61	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTGGTCCCACTGCGCGTGA

C57-2	35	15	TCCGAGCTCCACGTG
-------	----	----	-----------------

[0087] **1-3: 앵타머 스크리닝에 사용된 금 나노입자 색도 변화 분석법**

[0088] 실시예1-1에서 제조한 2nM의 금 나노입자와 실시예1-2에서 제조한 8 μM의 34개의 앵타머 후보군은 각각 완충용액(10% MeOH, 100mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, and 1mM CaCl₂가 초순수물 속에 녹아 있는 용액)에 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후, 25 μM의 테부코나졸을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그 다음 상기 용액에 2M NaCl을 첨가하여 염 유발 금 뭉침 현상(salt induced gold aggregation)을 유도하여 UV/VIS 분광기(Ultaspec 6300 Amersham Biosciences)를 이용하여 금 나노입자의 UV 흡광도를 측정하였다. 이는 도 1의 모식도와 같다.

[0089] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이, 검출한도인 A650/A520 ratio 값으로 테부코나졸이 안 들어간 음성대조군 값과 테부코나졸이 들어간 양성대조군 값을 종합적으로 고려하여 앵타머 7 종을 선별하였다.

[0091] **1-4: 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 특이적 앵타머 결합력 확인**

[0092] 앵타머 7 종의 특정 타겟에만 결합하는 여부를 확인하기 위한 특이성 시험(Specificity test)을 금 나노입자 색도 변화 분석법 기반으로 하였다. 테부코나졸에 대해 반응성이 좋았던 앵타머 7 종을 선별하여 테부코나졸, 메페나셋(Mefenacet), 이나벤파이드, 펜사이큐론(Pencycuron) 및 이프로벤포스에 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하는 특이성 시험(specificity test)을 진행하였다.

[0093] 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이, 7종의 앵타머가 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스에 대하여 특이적으로 결합하는 것을 확인하였으며, 결합력이 가장 좋은 앵타머는 C51-2 앵타머인 것을 확인하였으며, C51-2 핵산 앵타머의 예상 2차 구조는 도 6과 같다.

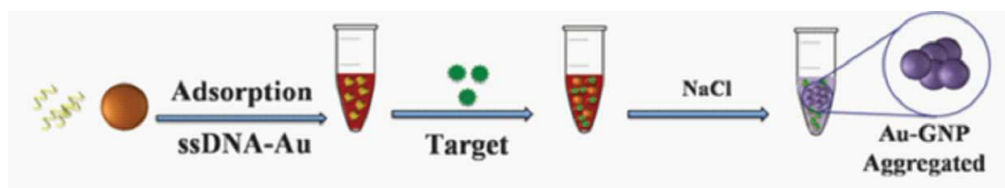
[0095] **1-5: 테부코나졸, 이나벤파이드 및 이프로벤포스 특이적 앵타머의 농도별 결합력 확인**

[0096] 앵타머 C51-2의 농도별 결합력을 ITC(Isothermal Titration Calorimetry) 분석법으로 확인한 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 앵타머 C51-2의 테부코나졸에 대한 Kd Value(Dissociation constant)는 147nM 임을 확인하였다.

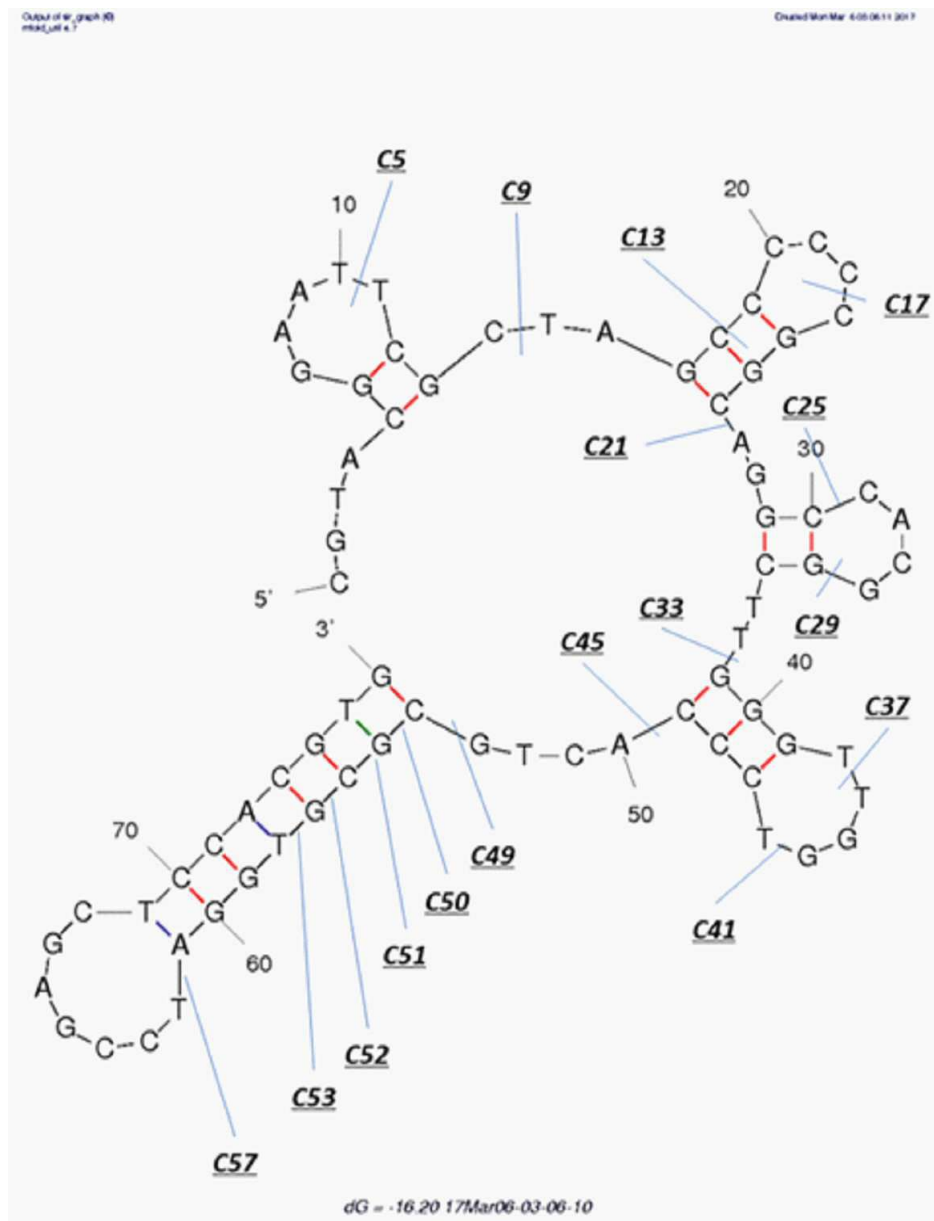
[0098] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



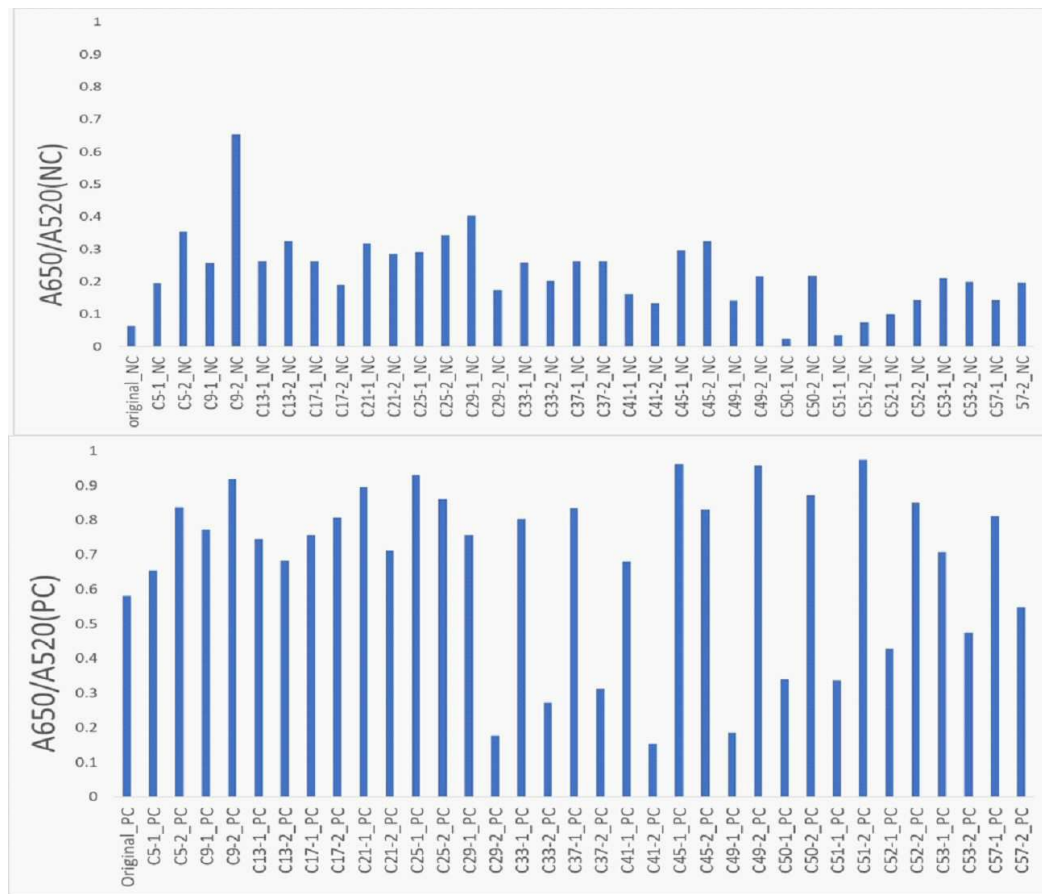
도면2



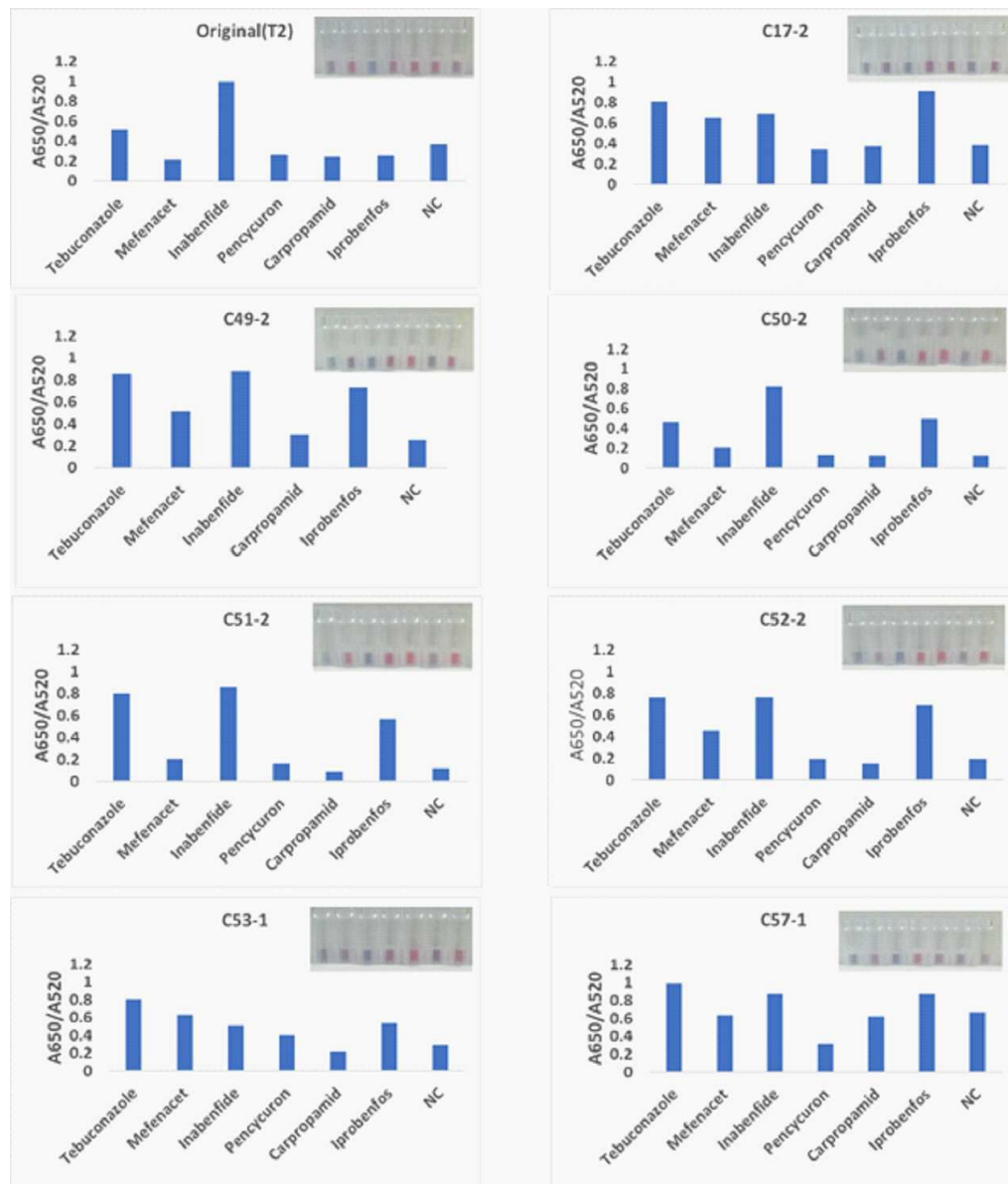
도면3

Aptamer candidate	SEQ ID NO.	Size (mer)	Sequence(5' → 3')
Original (T2)	1	76	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C5-1	2	10	CGTACGGAAT
C5-2	3	66	TCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C9-1	4	14	CGTACGGAATTCGC
C9-2	5	62	TAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C13-1	6	18	CGTACGGAATTCGCTAGC
C13-2	7	58	CCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C17-1	8	22	CGTACGGAATTCGCTAGCCCC
C17-2	9	54	CGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C21-1	10	26	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGC
C21-2	11	50	AGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C25-1	12	30	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGC
C25-2	13	46	CACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C29-1	14	34	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACG
C29-2	15	42	GCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C33-1	16	38	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTT
C33-2	17	38	GGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C37-1	18	42	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGT
C37-2	19	34	TGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C41-1	20	45	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGG
C41-2	21	31	TCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C45-1	22	49	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCC
C45-2	23	23	ACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C49-1	24	53	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTG
C49-2	25	23	CGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C50-1	26	54	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGC
C50-2	27	22	GCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C51-1	28	55	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCG
C51-2	29	21	CGTGGATCCGAGCTCCACGTG
C52-1	30	56	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGC
C52-2	31	20	GTGGATCCGAGCTCCACGTG
C53-1	32	57	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCG
C53-2	33	19	TGGATCCGAGCTCCACGTG
C57-1	34	61	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGTTGGTCCCACTGCGCGTGA
C57-2	35	15	TCCGAGCTCCACGTG

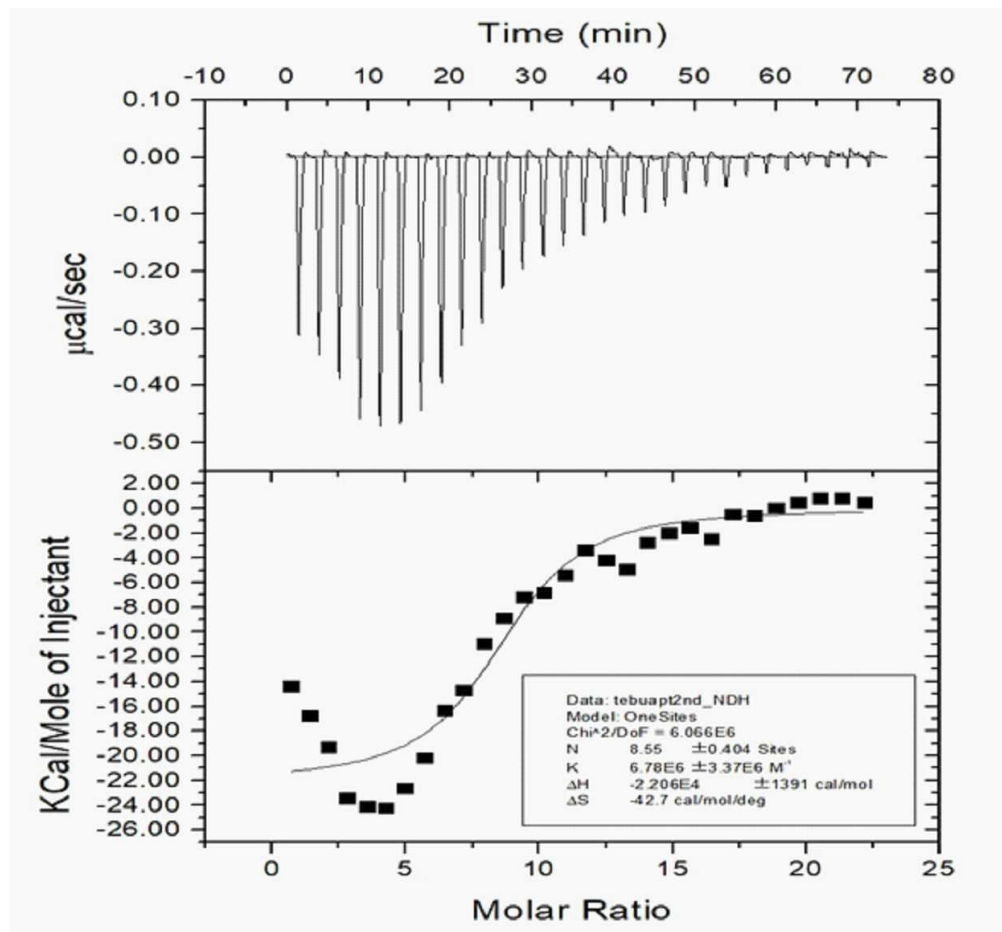
도면4



도면5



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> DNA aptamer binding to tebuconazole, Inabenfide and Iprobenfos
with specificity and Uses thereof
- <130> P18-B007
- <160> 35
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 76
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Original(T2)
- <400> 1

cgtagcgaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctgcgcgtgg 60

atccgagctc cactgtg 76

<210> 2
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C5-1
 <400> 2
 cgtacggaat 10
 <210> 3
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C5-2
 <400> 3
 tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctgcgcgtgg atccgagctc 60
 cacgtg 66
 <210> 4
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C9-1
 <400> 4
 cgtacggaat tcgc 14
 <210> 5
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C9-2
 <400> 5
 tagcccccgc gcaggccacg gcttgggttg gtccactgc gcgtggatcc gagctccacg 60
 tg 62
 <210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223>	C13-1	
<400>	6	
cgtacggaat tcgctagc		18
<210>	7	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C13-2	
<400>	7	
cccccggcag gccacggctt gggttgggtcc cactgcgcgt ggatccgagc tccacgtg		58
<210>	8	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C17-1	
<400>	8	
cgtacggaat tcgctagccc cc		22
<210>	9	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C17-2	
<400>	9	
cggcaggcca cggcttgggt tgggtcccact gcgcgtggat ccgagctcca cgtg		54
<210>	10	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C21-1	
<400>	10	
cgtacggaat tcgctagccc cccggc		26
<210>	11	
<211>	50	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C21-2
 <400> 11
 aggccacggc ttgggttggt ccactgcgc gtggatccga gctccacgtg 50
 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C25-1
 <400> 12
 cgtacggaat tcgctagccc cccggcaggc 30
 <210> 13
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C25-2
 <400> 13
 cacggcttgg gttggtccca ctgcgcgtgg atccgagctc cacgtg 46
 <210> 14
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C29-1
 <400> 14
 cgtacggaat tcgctagccc cccggcaggc cacg 34
 <210> 15
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C29-2
 <400> 15
 gcttgggttg gtccactgc gcgtggatcc gagctccacg tg 42

<210>	16	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C33-1	
<400>	16	
	cgtacggaat tcgctagccc cccggcaggc cacggctt	38
<210>	17	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C33-2	
<400>	17	
	gggttggtcc cactgcgcgt ggatccgagc tccacgtg	38
<210>	18	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C37-1	
<400>	18	
	cgtacggaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gt	42
<210>	19	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C37-2	
<400>	19	
	tggtcccact gcgcgtggat ccgagctcca cgtg	34
<210>	20	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C41-1	
<400>	20	

cgtagcgaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttgg	45
<210> 21	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C41-2	
<400> 21	
tcccactgcg cgtggatccg agctccacgt g	31
<210> 22	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C45-1	
<400> 22	
cgtagcgaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccc	49
<210> 23	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C45-2	
<400> 23	
actgcgcgtg gatccgagct ccacgtg	27
<210> 24	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C49-1	
<400> 24	
cgtagcgaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctg	53
<210> 25	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> C49-2

<400> 25

cgcggtggatc cgagctccac gtg 23

<210> 26

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C50-1

<400> 26

cgtacggaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctgc 54

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C50-2

<400> 27

gcgtggatcc gagctccacg tg 22

<210> 28

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C51-1

<400> 28

cgtacggaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctgcg 55

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C51-2

<400> 29

cgtggatccg agctccacgt g 21

<210> 30

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C52-1

<400> 30

cgtagcgaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctgcgc 56

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C52-2

<400> 31

gtggatccga gctccacgtg 20

<210> 32

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C53-1

<400> 32

cgtagcgaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctgcgcg 57

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C53-2

<400> 33

tggatccgag ctccacgtg 19

<210> 34

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C57-1

<400> 34

cgtagcgaat tcgctagccc cccggcaggc cacggcttgg gttggtccca ctgcgcgtgg 60

a 61

<210> 35
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> C57-2
<400> 35
tccgagctcc acgtg

15