



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월17일
(11) 등록번호 10-2328488
(24) 등록일자 2021년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) G01N 21/73 (2006.01)
G01N 30/74 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
G01N 21/73 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0082301
(22) 출원일자 2021년06월24일
심사청구일자 2021년06월24일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080042872 A
KR1020100009031 A

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
윤미용
서울특별시 성북구 화랑로 214,109동 203호(석관동, 래미안석관)
장대혁
서울특별시 성동구 무학봉12길 2(하왕십리동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 8 항

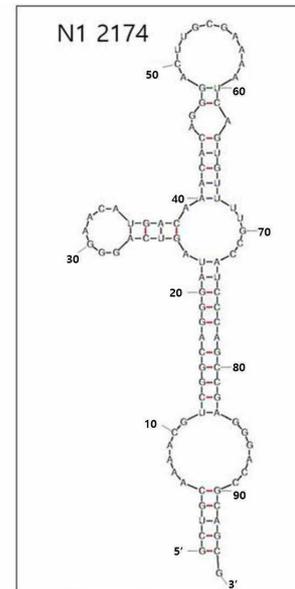
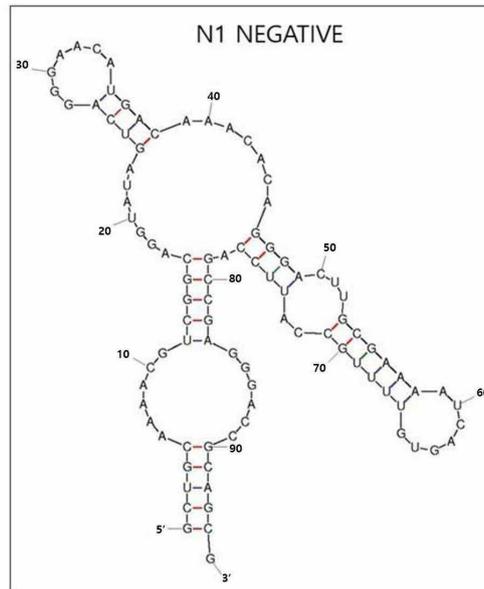
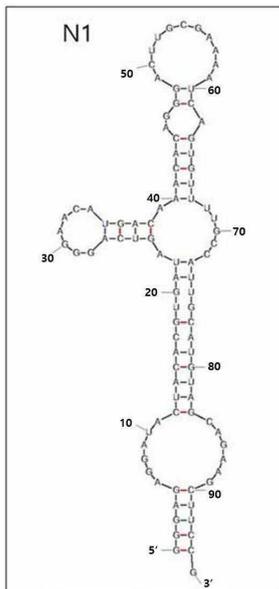
심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 앵타머에 관한 것으로, 상기 앵타머는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하여 니켈 이온 또는 코발트 이온을 분리 또는 검출하는 데에 도움을 줄 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 30/74 (2013.01)
C12N 2310/16 (2013.01)

(72) 발명자

이선영

서울특별시 도봉구 도봉로136길 19, 201동 401호(창동)

박창제

서울특별시 노원구 한글비석로 91, 108동 405호(하계동, 하계1차청구아파트)

차균호

대전광역시 유성구 문화원로 77, 1005호(봉명동, 그랑펠리체)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415170046
과제번호	20201207
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	원전해체방폐물안전관리기술개발(R&D)
연구과제명	원전 해체발생 방사성폐액 처리 성능 향상을 위한 친환경 바이오 소재 공정 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 앵타머는 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합하는 앵타머.

청구항 3

청구항 1 또는 2 중 어느 한 항의 앵타머를 포함하는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 조성물.

청구항 4

청구항 1 또는 2 중 어느 한 항의 앵타머가 고정화된 기판을 포함하는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 마이크로어레이.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 기판은 비드(bead), 막(membrane), 마이크로 타이터 플레이트(microtiter plate) 및 칩(chip)으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 마이크로어레이.

청구항 6

청구항 1 또는 2 중 어느 한 항의 앵타머가 충전된 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 컬럼.

청구항 7

청구항 1 또는 2 중 어느 한 항의 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 시료는 물, 토양 및 폐기물 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 국내 원전에서 발생하는 방사성 폐액은 방사선 제염 처리를 거쳐 방사성 물질을 제거한다. 방사선 제염 방법, 즉 방사성 물질이 포함된 폐액에서 방사성 물질을 제거하는 방법은 여과 처리법(투과성 매질로 부유물, 불용성 물질 및 고체 입자를 분리하는 방법), 증발처리법(증발기를 통해 휘발성 및 비휘발성 물질을 분리하는 방법), 분리처리법(방사선 입자 및 이온을 분리하는 방법) 등이 있다. 방사선 제염 순도를 높이기 위해 위 공정들이 혼합하여 사용되며, 각 공정에 필요한 다양한 설비들 및 처리 비용이 발생하게 됨. 또한, 각 공정에서 불가분하게 발생하는 여러 폐기물이 나오게 되며 이를 처리하기 위한 추가적인 비용이 발생하게 된다. 따라서, 현재의 방사선 제염 과정은 다양한 처리 과정과 다양한 폐기물 발생, 그에 대한 처리 비용이 요구된다.

[0004] 한편, 앵타머는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 갖는 분자이고, 분자 내 수소결합에 의해 특정 3차원 구조를 갖을 수 있으며, 이러한 3차원의 공간적 구조를 통해 표적에 특이적으로 결합할 수 있다. 앵타머는 표적에 특이적이기 때문에, 일부 앵타머는 표적 물질의 기능을 억제할 수 있고, 표적에 결합함으로써 세포 내 신호 전달 경로를 차단할 수 있기 때문에 표적을 특이적으로 억제하기 위한 핵산 약제로서 주목을 받아왔다.

[0005] 앵타머는 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)를 통해 선별될 수 있다. 앵타머는 특정 3차원 구조를 형성하여 표적에 결합될 수 있으며, 높은 친화성, 높은 특이성, 합성의 용이성을 가지고 있을 뿐 아니라 친환경 바이오 소재라는 장점을 갖는다. 앵타머는 나노몰(nM) 수준의 결합력을 갖는바 앵타머를 활용하여 낮은 농도의 표적까지도 포집할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1238297호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 마이크로어레이를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 컬럼을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 1. 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머.

[0015] 2. 위 1에 있어서, 상기 앵타머는 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합하는 앵타머.

[0016] 3. 위 1 또는 2 중 어느 하나의 앵타머를 포함하는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 조성물.

[0017] 4. 위 1 또는 2 중 어느 하나의 앵타머가 고정화된 기판을 포함하는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 마이크로어레이.

[0018] 5. 위 4에 있어서, 상기 기판은 비드(bead), 막(membrane), 마이크로 타이터 플레이트(microtiter plate) 및

칩(chip)으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 마이크로어레이.

- [0019] 6. 위 1 또는 2 중 어느 하나의 앵타머가 증진된 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 컬럼.
- [0020] 7. 위 1 또는 2 중 어느 하나의 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출 방법.
- [0021] 8. 위 7에 있어서, 상기 시료는 물, 토양 및 폐기물 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료인 방법.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 앵타머를 이용하면 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나를 분리 또는 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 N1 2174 앵타머와 2개의 염기가 상이한 서열을 갖는 앵타머(N1 NEGATIVE)가 N1 2174 앵타머와 상이한 2차 구조를 형성하는 것을 확인한 것이다.
- 도 2는 N1 2174 앵타머가 증진된 컬럼을 통과한 폐액 속에 남아있는 Ni²⁺의 농도를 측정하여 N1 2174 앵타머의 니켈 이온에 대한 결합력을 확인한 것이다.
- 도 3은 N1 2174 앵타머가 증진된 컬럼을 통과한 폐액 속에 남아있는 Co²⁺의 농도를 측정하여 N1 2174 앵타머의 코발트 이온에 대한 결합력을 확인한 것이다.
- 도 4는 N1 2174 앵타머와 2개 내지 7개의 염기가 상이한 서열을 갖는 앵타머들(N1 MUT1, N1 MUT2, N1 MUT3, N1 MUT4)이 N1 2174 앵타머와 상이한 2차 구조를 형성하는 것을 확인한 것이다.
- 도 5는 N1 앵타머와 N1 2174 앵타머의 공통 서열을 포함하는 다른 앵타머들(N1 74, N1 21)이 N1 2174 앵타머와 상이한 2차 구조를 형성하는 것을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 앵타머는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0030] (서열번호 1:
- [0031] GCUGCAAAACGUCGCGCAGGGGAUAGUCAGGGAACAUGACAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUGCCAUCCCAGCCGAGGGACCGCAGCG)
- [0032] 앵타머(aptamer)란 특정 표적 물질에 선택적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 또는 펩타이드(peptide) 분자를 의미하며, 앵타머는 표적의 3차원적인 구조를 인식해 결합하는 특징을 가지고 있다. 앵타머는 고유의 구조에 따라 표적 물질에 대한 결합능을 가질 수 있다. 또한 생물학적 생산이 아닌 화학적 합성법으로 생산하기 때문에 배치 재현성이 높고 물질 안정성도 우수하며 제조 가격도 저렴하다는 장점을 갖는다. 본 발명의 앵타머는 통상의 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 제조된 것일 수 있고, 필요에 따라 적절히 변형된 방법에 의해 제조된 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 앵타머는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합할 수 있어 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나를 포함하는 시료로부터 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나를 검출 또는 분리하는 데에 이용할 수 있다.
- [0034] 용어 “검출”은 특정 물질에 대한 선택적 반응을 통해 상기 특정 물질의 존재를 확인하는 모든 행위(예를 들면, 형광 변화, 흡광 변화 등)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0035] 용어 “분리”는 특정 물질을 함유하고 있거나 함유하는 것으로 의심되는 대상으로부터 상기 특정 물질만을 별도로 구분하는 것을 의미하며, 상기 특정 물질을 대상으로부터 “제거”하거나 특정 물질을 “회수”하여 재사용하는 것을 포함한다.

- [0036] 일 예에 따르면, 본 발명의 앵타머는 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [0037] 앵타머는 표적 물질에 대한 결합성 및 안정성을 높이기 위해, 각 뉴클레오티드의 당 잔기, 구체적으로 리보오스 또는 디옥시리보스가 수식될 수 있다. 상기 수식은 당 잔기의 2' 위치, 3' 위치 및 4' 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 산소 원자를 다른 원자로 치환한 것일 수 있다. 수식의 예로는 플루오로화, 0-알킬화, 0-알릴화, S-알킬화, S-알릴화, 아미노화 등이 포함될 수 있다. 상기와 같은 당 잔기의 변형은 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.
- [0038] 앵타머는 표적 물질에 대한 결합성을 높이기 위해, 핵산염기가 변형될 수 있다. 상기 핵산염기의 변형은 5 위치의 피리미딘 변형, 6 위치의 푸린 변형, 8 위치의 푸린 변형, 환외(環外) 아민에서의 변형, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모로의 치환 또는 5-요오드-우리실로의 치환 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 앵타머는 뉴클레아제 및 가수분해효소 등에 대해 내성을 갖도록 인산기가 변형될 수 있다. 예를 들면, 상기 인산기는 티오에이트, 디티오에이트, 아미데이트, 포름아세탈, 3'-아민 등으로 치환될 수 있다. 나아가, 상기 DNA 앵타머는 3' 말단 또는 5' 말단의 변형을 포함할 수 있고, 상기 변형은 캡핑이나, 바이오티닐, 폴리에틸글리콜, 아미노산, 펩티드, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일(myristoyl), 리소콜릭-올레일(lithocolic-oleyl), 도코사닐(docosanyl), 라우로일(lauroyl), 스테아로일(stearoyl), 팔미토일(palmitoyl), 올레오일(oleoyl), 리놀레오일(linoleoyl), 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 향암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등이 부가된 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 조성물을 제공한다.
- [0042] 일 예에 따르면, 조성물은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함할 수 있다.
- [0043] 다른 예에 따르면, 조성물은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함할 수 있다.
- [0044] 앵타머는 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 앵타머는 발색 효소, 형광물질, 방사성 동위 원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표시된 접합체일 수 있다. 발색 효소는 퍼록시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 산성 포스파타제일 수 있고, 형광물질은 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로 테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸, Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(RITC), PE(Phycoerythrin) 또는 로다민일 수 있다.
- [0046] 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 앵타머를 포함함으로써, 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나를 포함하는 시료로부터 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나를 검출 또는 분리하는 데에 이용할 수 있다.
- [0047] 용어 “검출” 및 “분리” 는 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0050] 일 예에 따르면, 마이크로어레이는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머가 고정화된 기관을 포함할 수 있다.
- [0051] 다른 예에 따르면, 마이크로어레이는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합하는 앵타머가 고정화된 기관을 포함할 수 있다.
- [0052] 앵타머, 용어 “분리” 및 용어 “검출” 은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 기관은 결합 특성을 보유하고 앵타머가 부착될 수 있는 임의의 기관을 의미한다. 통상적으로 기관은 비드(bead), 막(membrane), 마이크로 타이터 플레이트(microtiter plate) 및 칩(chip)으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다. 앵타머를 기관에 고정 또는 적용시키기 전에 앵타머를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 결합 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독 중합체 테일링(homopolymer tailing); 지방족기, NH₂기, SH기 또는 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링; 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링;을 포함할

수 있다. 상기 고정은 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 앵타머는 에폭시 화합물 또는 알데하이드기를 포함하도록 변형된 유리 표면에 결합될 수 있고, 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 앵타머는 에틸렌글리콜 올리고머나 디아민과 같은 링커를 통해 기관에 고정될 수도 있다.

- [0054] 마이크로어레이란 기관 상에 올리고뉴클레오타이드 그룹이 높은 밀도로 일정한 영역에 고정화되어 있는 것을 의미한다. 마이크로어레이는 통상의 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 제조된 것일 수 있고, 필요에 따라 적절히 변형된 방법에 의해 제조된 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 마이크로어레이는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머가 고정화된 기관을 포함하므로 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나를 분리 또는 검출하는 데에 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출용 컬럼을 제공한다.
- [0058] 일 예에 따르면, 컬럼은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머가 충전된 것일 수 있다.
- [0059] 다른 예에 따르면, 컬럼은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합하는 앵타머가 충전된 것일 수 있다.
- [0060] 앵타머, 용어 “분리” 및 용어 “검출”은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 컬럼은 통상의 기술 분야에 잘 알려진 것을 사용할 수 있으나 앵타머가 충전될 수 있는 것이라면 제한되지 않는다. 컬럼은 기관에 고정화된 앵타머가 충전된 것일 수 있고, 기관은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 컬럼은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머가 충전되어 있으므로 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나를 분리 또는 검출하는 데에 사용될 수 있다.
- [0064] 본 발명은 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 분리 또는 검출 방법을 제공한다.
- [0065] 일 예에 따르면, 방법은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 특이적으로 결합하는 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0066] 다른 예에 따르면, 방법은 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합하는 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0067] 앵타머, 용어 “분리” 및 용어 “검출”은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 시료는 니켈 이온 또는 코발트 이온을 함유하고 있거나 함유하고 있는 것으로 의심되는 것이라면 제한되지 않고, 예를 들면 물, 토양 및 폐기물 중 어느 하나 이상에서 채취된 것일 수 있다.
- [0069] 상기 앵타머는 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나에 대해 결합력이 우수하므로, 앵타머를 시료와 접촉시키면 시료 내에 포함된 니켈 이온 및 코발트 이온 중 적어도 하나의 이온이 앵타머와 결합하여 해당 시료로부터 상기 니켈 이온 또는 코발트 이온을 검출 또는 분리할 수 있다.
- [0070] 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계는 통상의 기술 분야에 잘 알려진 방법에 의해 수행되는 것일 수 있고, 예를 들면 앵타머가 충전된 컬럼에 시료를 통과시켜 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 컬럼은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0075] **실시예**
- [0076] 본 발명자들은 니켈 이온(Ni^{2+}) 및 코발트 이온(Co^{2+})에 특이적으로 결합하는 앵타머(N1 2174)를 발굴하였다. mfold 및 NUPACK 프로그램을 통해 앵타머가 안정적인 2차 구조를 형성하는지 여부를 확인하였다.
- [0078] **1. N1 2174 앵타머의 2차 구조 및 열역학적 안정성 확인**
- [0079] 양성 대조군으로 니켈 이온 및 코발트 이온에 특이적으로 결합할 수 있다고 알려진 N1 앵타머의 서열을 사용하였다. 하기 표 1은 N1(Positive control), N1 NEGATIVE(Negative control) 및 N1 2174 앵타머의 서열을 나타낸

것이다.

표 1

[0080]

Aptamer	서열번호	Sequence
N1 2174	1	GCUGCAAAACGUCGGCAGGGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCG AAAUCAGUGUUUGCCAUC <u>CCAGCCGAGGGACCGCAGCG</u>
N1 (Positive control)	2	GGGAGAGGAUACUACACGUGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCG AAAUCAGUGUUUGCCAUC <u>UGCAUGCAGAAGCUUCCG</u>
N1 NEGATIVE (Negative control)	3	GCUGCAAAACGUCGGCAGGUAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCG AAAUCAGUGUUUGCCAUC <u>CCAGCCGAGGGACCGCAGCG</u>

[0081]

도 1에 나타난 바와 같이, N1 2174 앵타머의 경우 N1 앵타머와 유사한 2차 구조를 형성함을 확인할 수 있다. N1 NEGATIVE 앵타머의 경우, N1 2174와 20번째 및 75번째 염기 서열만이 상이하고 그 외의 서열은 동일하나 N1 앵타머 또는 N1 2174 앵타머와는 전혀 다른 2차 구조를 형성하는 것을 확인하였다(도 1).

[0082]

다음으로 앵타머의 ΔG 값을 확인하였다. ΔG 값이 더 작을수록 열역학적으로 안정한 구조를 갖게 된다. 하기 표 2에 나타난 바와 같이, N1 2174는 N1보다 더 낮은 ΔG 값을 가져 보다 안정적인 구조를 형성함을 확인할 수 있다. 한편, N1 NEGATIVE의 경우, N1 보다 ΔG 값이 작으나, 2차 구조가 상이하므로 후술할 바와 같이 앵타머의 결합력이 달라짐을 알 수 있다.

표 2

[0083]

Aptamer	ΔG 값
N1 2174	-30.33
N1 (Positive control)	-20.43
N1 NEGATIVE (Negative control)	-24.79

[0085]

2. N1 2174 앵타머의 Ni^{2+} , Co^{2+} 에 대한 결합력 확인

[0086]

ICP-OES PlasmaQuant@PQ 9000를 이용하여, 앵타머가 결합된 비드(Aptamer-bead)가 충전된 컬럼 통과 후 폐액 내 Ni^{2+} , Co^{2+} 의 농도를 측정하였다. 컬럼 통과 전 폐액 내 이온의 농도는 두 이온 모두 10 μM 로 설정 후 실험을 진행하였다. 도 2 및 도 3의 앵타머 없이 비드만이 충전된 컬럼 통과 후의 폐액(Bead only)에 포함된 이온의 농도는 초기 농도인 10 μM 을 의미한다.

[0087]

도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, N1 2174 앵타머는 N1 앵타머에 비해 더 효과적으로 Ni^{2+} 및 Co^{2+} 에 결합하는 것을 확인하였다. 이는 N1 2174 앵타머가 N1 앵타머에 비해 Ni^{2+} , Co^{2+} 제거에 더 효과적으로 이용될 수 있음을 시사한다. 한편, N1 NEGATIVE 앵타머는 N1 2174와 2개의 염기만 상이하나 전혀 다른 2차 구조를 형성하여 Ni^{2+} , Co^{2+} 에 대해 특이적으로 결합하지 못한다는 것을 확인하였다(도 2 및 도 3).

[0089]

3. 비교예 (1)

[0090]

본 발명자들은 비교예로 N1 2174 앵타머와 2 내지 7개의 염기가 상이한 서열을 갖는 앵타머들의 2차 구조와 열역학적 안정성을 확인하였다.

[0091]

3-1. 비교 앵타머의 염기 서열

[0092]

하기 표는 본 발명 N1 2174 앵타머와 비교예로 사용된 앵타머들의 서열을 나타낸 것이다.

표 3

[0093]

Aptamer	서열번호	Sequence
N1 2174	1	GCUGCAAACGUCGGCAGGGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUCCAGCCGAGGGACCGCAGCG
N1 MUT1	4	GCU <u>A</u> CCAAACGUCGGCAGCCAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUCCAGCCGAGGGACCGCAGC <u>A</u>
N1 MUT2	5	GCUGCAAACGUCGGCAG <u>A</u> UAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUGGCAGCCGAGGGACCGCAGCG
N1 MUT3	6	GCUGCAAACGUCGGCAGG <u>A</u> AUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUACCAGCCGAGGGACCGCAGCG
N1 MUT4	7	GCUGCGGCCCGUCGGCAGGGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUACAGCCGAGGGGCCGCAGCG

[0094]

하기 표는 본 발명 N1 2174 앵타머와 비교예로 사용된 앵타머들의 ΔG값을 나타낸 것이다.

표 4

[0095]

Aptamer	ΔG값
N1 2174	-30.33
N1 MUT1	-18.03
N1 MUT2	-22.74
N1 MUT3	-21.69
N1 MUT4	-40.21

[0096]

도 4의 N1 MUT3 앵타머의 2차 구조에서 확인할 수 있듯이, N1 2174 앵타머 서열과 단 2개의 염기만 달라져도 전혀 상이한 2차 구조를 형성하였다. 또한, 상기 표 4에 나타난 바와 같이, N1 MUT4 앵타머의 ΔG값은 -40.21로 N1 앵타머에 비해 열역학적으로 안정하나, 도 4에서 확인할 수 있듯이 그 2차 구조는 전혀 상이한 것을 확인하였다.

[0097]

뿐만 아니라, N1 MUT1, N1 MUT2 앵타머도 N1 2174 앵타머 서열과 각 5개, 4개의 서열만이 상이함에도 전혀 다른 2차 구조를 형성하는 것을 확인할 수 있다(도 4).

[0099]

4. 비교예 (2)

[0100]

추가적으로 본 발명자들은 N1 앵타머와 N1 2174 앵타머의 공통 서열을 포함하는 다른 앵타머들의 2차 구조와 열역학적 안정성을 확인하였다.

[0101]

하기 표는 본 발명 N1, N1 2174 앵타머와 비교예로 사용된 앵타머들의 서열을 나타낸 것이다.

표 5

[0102]

Aptamer	서열번호	Sequence
N1 2174	1	GCUGCAAACGUCGGCAGGGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUCCAGCCGAGGGACCGCAGCG
N1	2	<u>GGGAGAGGAUACUACACGUGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUUGCAUGUAGCAGAAGCUUCCG</u>
N1 74	8	<u>GGGAGAGGAUACUACACGUGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUCCAGCCGAGGGACCGCAGCG</u>
N1 21	9	GCUGCAAACGUCGGCAGGGAUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCAUUGCAUGUAGCAGAAGCUUCCG

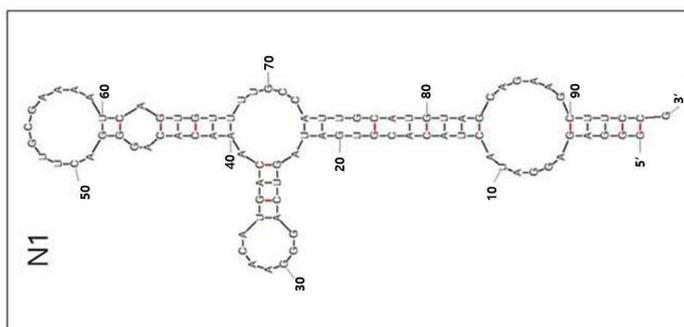
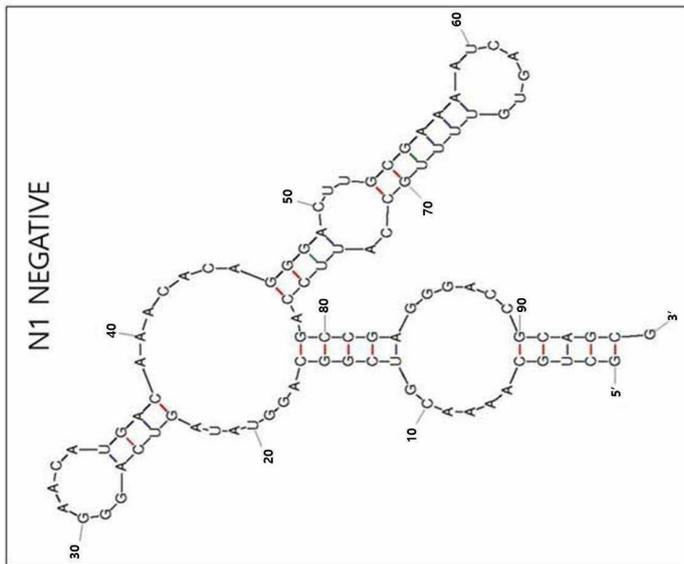
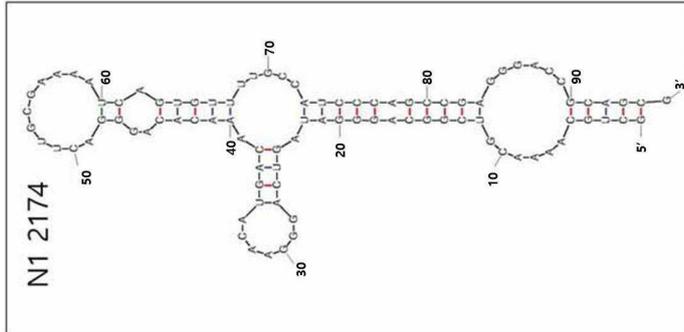
[0103]

N1 74 및 N1 21 앵타머의 경우, N1 앵타머 및 N1 2174 앵타머의 공통된 서열(AUAGUCAGGGAACAUGACAAACACAGGGACUUGCGAAAAUCAGUGUUUUGCCA; 서열번호 10)을 포함하나, 그 2차 구조는 전혀 다른 것을 확인할 수 있다(도 5). 즉, N1 2174 앵타머의 서열 중 N1 앵타머와 공통된 서열뿐만 아니라 그 외의 서열도 특유의 2차 구조 형성에 필수적이기 때문에, 서열번호 10의 염기 서열을 포함하는 앵타머라고 하더라도

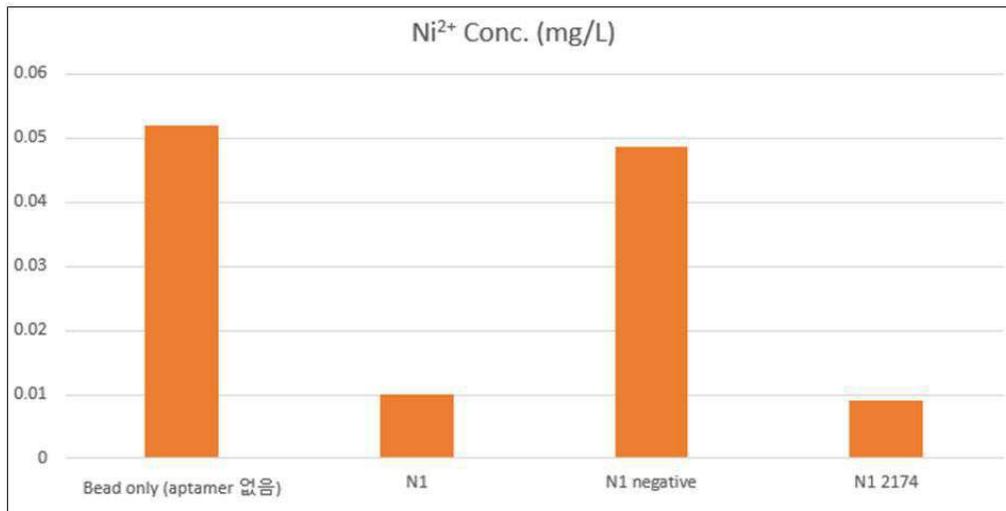
Ni^{2+} , Co^{2+} 에 대한 결합력이 존재하지 않을 수도 있음을 시사한다.

도면

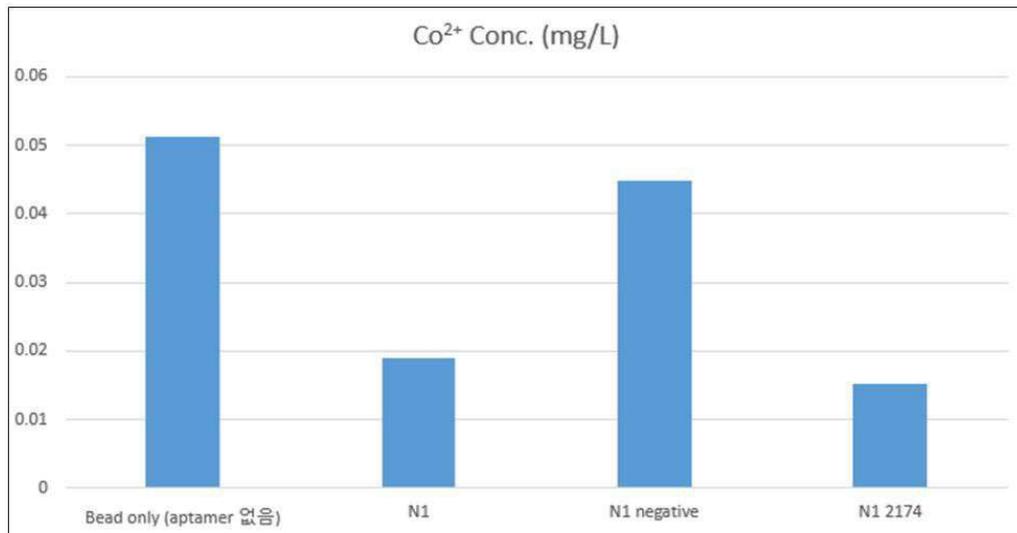
도면1



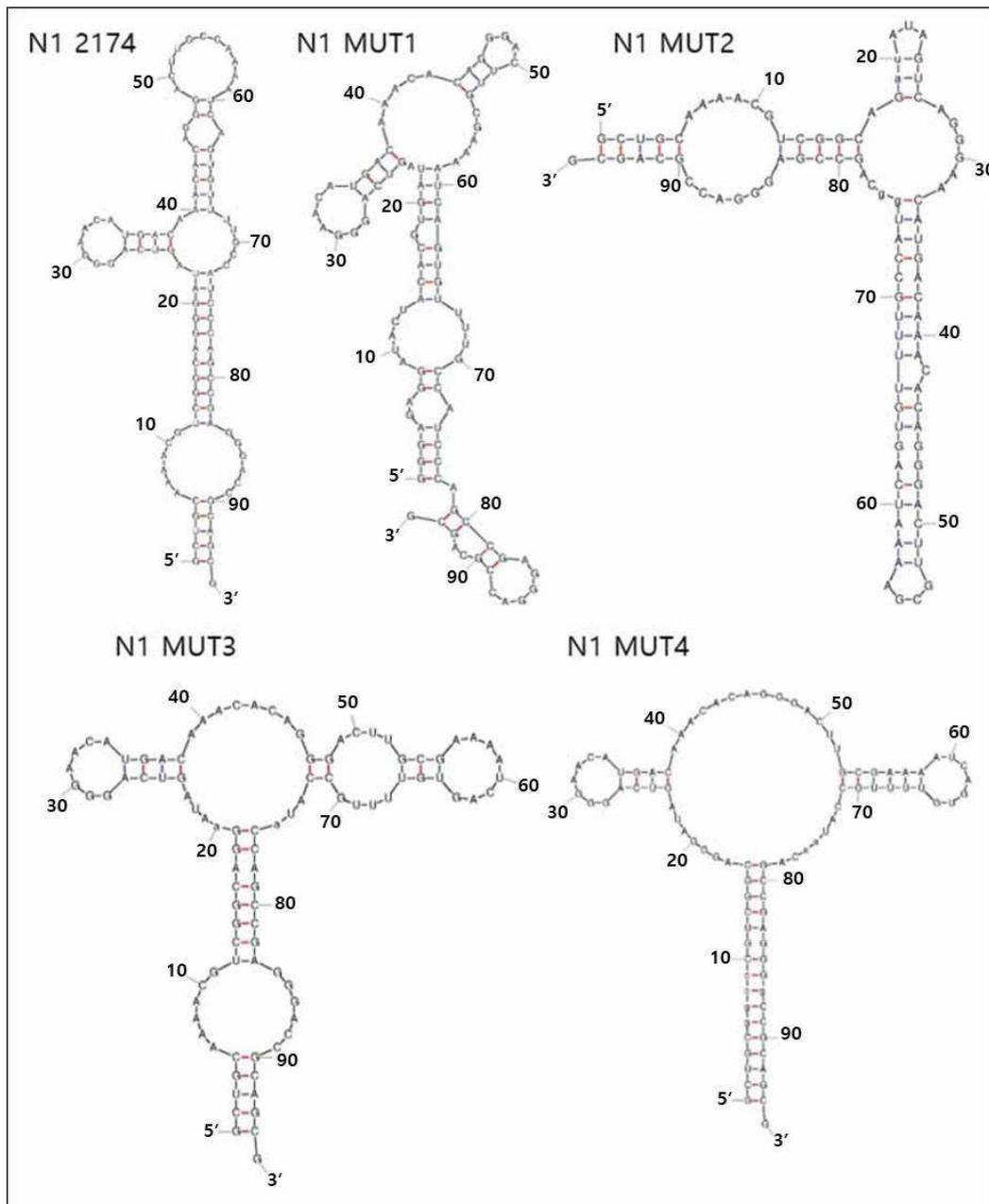
도면2



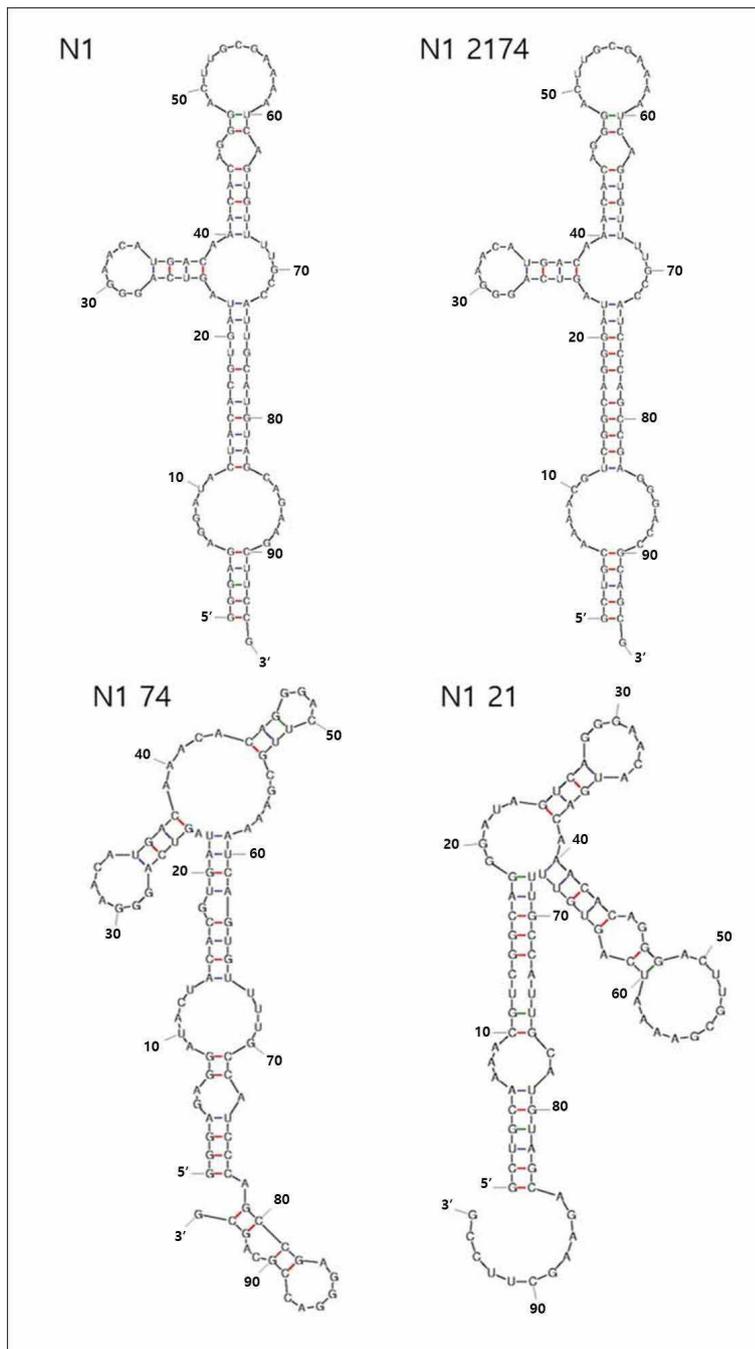
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Aptamer specifically binding to at least one of a nickel ion and a cobalt ion
- <130> 21P04025
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 2174 Aptamer
 <400> 1
 gcugcaaac gucggcaggg auagucaggg acaugacaa acacaggac uugcgaauu 60
 caguuuuug ccaucccagc cgaggaccg cagcg 95
 <210> 2

 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 Aptamer
 <400> 2
 gggagaggau acuacacug auagucaggg acaugacaa acacaggac uugcgaauu 60
 caguuuuug ccuugcaug uagcagaagc uuccg 95
 <210> 3
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 NEGATIVE Aptamer
 <400> 3
 gcugcaaac gucggcaggu auagucaggg acaugacaa acacaggac uugcgaauu 60
 caguuuuug ccuucccagc cgaggaccg cagcg 95

 <210> 4
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 MUT1 Aptamer
 <400> 4
 gcucaaac gucggcagcc auagucaggg acaugacaa acacaggac uugcgaauu 60
 caguuuuug ccaucccagc ggaggaccg cagca 95
 <210> 5
 <211> 95

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 MUT2 Aptamer
 <400> 5
 gcugcaaac gucggcagau auagucaggg aacaugacaa acacaggac uugcgaaaau 60
 caguguuuug ccauggcagc cgagggaccg cagcg 95

<210> 6
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 MUT3 Aptamer
 <400> 6
 gcugcaaac gucggcagga auagucaggg aacaugacaa acacaggac uugcgaaaau 60
 caguguuuug ccuaccagc cgagggaccg cagcg 95

<210> 7
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 MUT4 Aptamer
 <400> 7
 gcugcggccc gucggcaggg auagucaggg aacaugacaa acacaggac uugcgaaaau 60
 caguguuuug ccuaacagc cgaggggccg cagcg 95

<210> 8
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N1 74 Aptamer
 <400> 8
 gggagaggau acuacacgug auagucaggg aacaugacaa acacaggac uugcgaaaau 60
 caguguuuug ccuuccagc cgagggaccg cagcg 95

<210> 9
 <211> 95
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1 21 Aptamer

<400> 9

gugcaaac gucgaggg auagucaggg aacaugacaa acacagggac uugcgaaaau 60

caguuuuug ccuugcaug uagcagaagc uuccg 95

<210> 10

<211> 54

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 10

auagucaggg aacaugacaa acacagggac uugcgaaaau caguuuuug ccu 54