



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0042872
(43) 공개일자 2008년05월15일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7005597</p> <p>(22) 출원일자 2008년03월07일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2008년03월07일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2006/030617
국제출원일자 2006년08월04일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/106118
국제공개일자 2007년09월20일</p> <p>(30) 우선권주장
11/202,380 2005년08월11일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
더 보드 오브 트러스티즈 오브 더 유니버시티 오브 일리노이
미국 일리노이주 61801 어바나 에스. 라이트 506
헨리 어드미니스트레이션 빌딩 352</p> <p>(72) 발명자
루, 이
미합중국 일리노이주 61822, 샴페인, 워터빌
디알., 2512
리우, 쉘웬
미합중국 일리노이주 61801, 어바나, 201, 에이퍼
티. 콜로라도에비뉴, 703 이</p> <p>(74) 대리인
안광석, 조태연, 박영일, 김합곤</p> |
|---|---|

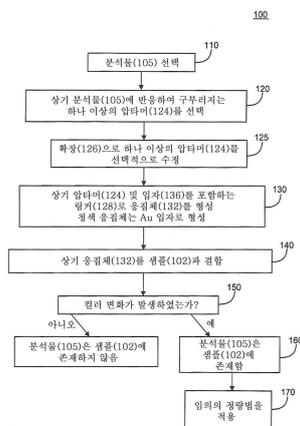
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 압타머-기반 비색 센서 시스템

(57) 요약

본 발명은 샘플 중 분석물의 존재 및 선택적으로 그 농도를 측정하기 위한 압타머-기반 비색 센서 시스템을 제공한다. 상기 센서 시스템을 사용하는 방법 및 상기 센서를 포함하는 키트 또한 제공된다. 상기 센서는 링커 및 올리고뉴클레오티드 기능성 입자를 사용하여 응집체를 형성하며, 이는 분석물에 반응하여 분리된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

분석물 탐지용 센서 시스템으로서,

상기 분석물에 반응하여 구부러지는 압타머를 포함하는 링커(linker); 및

제2 올리고뉴클레오티드에 연결된 제2 입자를 포함하고, 상기 제2 올리고뉴클레오티드가 상기 압타머의 적어도 일부분에 상보적인 것인 센서 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 링커는 확장(extension)을 포함하는 것인 센서 시스템.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오티드는 상기 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 센서 시스템.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장을 형성하는 염기의 적어도 일부분이, 상기 링커가 분석물 없이 고유적으로 안정한 2차 구조를 형성하는 것을 억제하는 것인 센서 시스템.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드에 연결된 제1 입자를 추가로 포함하고, 상기 제1 올리고뉴클레오티드가 상기 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 센서 시스템.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장은 1 내지 100개의 염기를 포함하고, 상기 염기의 적어도 50%는 제1 또는 제2 올리고뉴클레오티드 에 상보적인 것인 센서 시스템.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드의 일부분이 상기 확장에 상보적이 아닌 것인 센서 시스템.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물과 조합한 압타머의 하이브리드화(hybridization) 안정성이 제2 올리고뉴클레오티드와 압타머의 일부의 하이브리드화 안정성보다 큰 것인 센서 시스템.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 입자는 금속, 반도체, 자기화할 수 있는(magnetizable) 재료, 및 이들의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택된 재료를 포함하는 것인 센서 시스템.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 입자가 금을 포함하는 것인 센서 시스템.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물은 금속 이온인 것인 센서 시스템.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물은 거대 생체분자, 작은 생체분자, 및 유기 분자로 구성된 그룹으로부터 선택된 것인 센서 시스템.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커는 서열식별번호 46, 52, 54, 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체(variant)로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 센서 시스템.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 압타머는 서열식별번호 1-42 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 센서 시스템.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호 44 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체를 포함하는 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 제2 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호 45, 53, 55, 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 센서 시스템.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커는 서열식별번호 54를 포함하고, 상기 제1 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호 44를 포함하고, 상기 제2 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호 55를 포함하는 것인 센서 시스템.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서, 60분 미만의 반응 시간을 갖는 센서 시스템.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서, 23℃ 내지 37℃에서 10분 미만의 반응 시간을 갖는 센서 시스템.

청구항 19

분석물의 탐지 방법으로서,

응집체(aggregate)를 샘플과 결합하고;

상기 분석물에 반응한 컬러 변화를 탐지하는 것을 포함하며, 상기 응집체는

상기 분석물에 반응하여 구부러지는 압타머를 포함하는 링커; 및

제2 올리고뉴클레오티드에 연결된 제2 입자를 포함하고,

상기 제2 올리고뉴클레오티드가 상기 압타머의 적어도 일부분에 상보적인 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 응집체는 제1 올리고뉴클레오티드에 연결된 제1 입자를 추가로 포함하고, 상기 제1 올리고뉴클레오티드가 상기 링커의 일부분을 형성하는 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 21

청구항 19 또는 청구항 20에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오티드는 상기 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 22

청구항 19 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장을 형성하는 염기의 적어도 일부분이, 상기 링커가 분석물 없이 고유적으로 안정한 2차 구조를 형성하는 것을 억제하는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 23

청구항 19 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장은 1 내지 100개의 염기를 포함하고, 상기 염기의 적어도 50%는 제1 또는 제2 올리고뉴클레오티드에 상보적인 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 24

청구항 19 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물과 조합한 압타머의 하이브리드화 안정성이 제2 올리고뉴클레오티드와 압타머의 일부의 하이브리드화 안정성보다 큰 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 25

청구항 19 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플의 이온 강도를 조정하는 것을 추가로 포함하는 분석물의 탐지 방법.

청구항 26

청구항 19 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서, 결합은 상기 응집체에 상기 샘플을 가하는 것 및 상기 샘플에 상기 응집체를 가하는 것으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 27

청구항 19 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 입자가 금을 포함하는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 28

청구항 19 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물은 금속 이온, 거대 생체분자, 작은 생체분자, 및 유기 분자로 구성된 그룹으로부터 선택된 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 29

청구항 19 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 압타머는 서열식별번호 1-42 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 30

청구항 19 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 제1 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호 44 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체를 포함하는 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,
 상기 제2 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호 45, 53, 55, 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 31

청구항 19 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 23℃ 내지 37℃에서 10분 미만의 반응 시간을 갖는 분석물의 탐지 방법.

청구항 32

청구항 19 내지 청구항 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합이 20℃ 내지 30℃에서 이루어지는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 33

청구항 19 내지 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서, 상기 응집체는 상기 분석물에 반응하여 분리(disaggregate)하는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 34

청구항 19 내지 청구항 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응은 샘플 중 분석물의 양에 비례하는 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 35

청구항 19 내지 청구항 34 중 어느 한 항에 있어서, 컬러 변화를 정량하는 것을 추가로 포함하는 분석물의 탐지 방법.

청구항 36

청구항 19 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플의 기원은 생물학적 소스(source), 산업 폐기물 스트림, 및 인간의 소비를 위해 끌어온 급수(water supply)로 구성된 그룹으로부터 선택된 것인 분석물의 탐지 방법.

청구항 37

분석물 탐지용 키트에 있어서,

응집체 형성용 시스템으로서, 상기 시스템은

상기 분석물에 반응하여 구부러지는 압타머를 포함하는 링커; 및

제2 올리고뉴클레오티드에 연결된 제2 입자;를 포함하고, 상기 제2 올리고뉴클레오티드가 상기 압타머의 적어도 일부분에 상보적인 것인 시스템 : 및

상기 응집체 형성 시스템을 포함하는 적어도 하나의 제1 용기 : 를 포함하며, 여기서 샘플은 제1 용기 및 제2 용기를 포함하는 그룹으로부터 선택된 용기에 가해질 수 있는 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 분석물과 조합한 압타머의 하이브리드화 안정성이 제2 올리고뉴클레오티드와 압타머의 일부의 하이브리드화 안정성보다 큰 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 39

청구항 37 또는 청구항 38에 있어서, 상기 압타머는 서열식별번호 1-42 및 그들의 보존적으로 변형된 변형체로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 40

청구항 37 내지 청구항 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 응집체를 형성하기 위한 사용설명서(instructions)를 추가로 포함하는 분석물 탐지용 키트.

청구항 41

청구항 37 내지 청구항 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 응집체 형성 시스템이 제1 올리고뉴클레오티드에 연결된 제1 입자를 추가로 포함하고, 상기 제1 올리고뉴클레오티드가 상기 링커의 일부분을 형성하는 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 42

청구항 37 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오티드가 상기 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 43

청구항 37 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장은 1 내지 100개의 염기를 포함하고, 상기 염기의

적어도 50%는 제1 또는 제2 올리고뉴클레오티드에 상보적인 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 44

청구항 37 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플의 이온 강도를 변경하기 위한 시약(reagent)을 추가로 포함하는 분석물 탐지용 키트.

청구항 45

청구항 37 내지 청구항 44 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플의 이온 강도를 변경하기 위한 사용설명서를 추가로 포함하는 분석물 탐지용 키트.

청구항 46

청구항 37 내지 청구항 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플의 pH를 변경하기 위한 시약을 추가로 포함하고, 상기 시약은 산 및 염기로 구성된 그룹으로부터 선택된 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 47

청구항 37 내지 청구항 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 응집체의 분리(disaggregation)에 반응하는 컬러 변화를 정량하기 위한 장치를 추가로 포함하는 분석물 탐지용 키트.

청구항 48

청구항 37 내지 청구항 47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치는 분광광도계 및 컬러 비교측정기(comparator)로 구성된 그룹에서 선택되는 것인 분석물 탐지용 키트.

청구항 49

청구항 37 내지 청구항 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물에 반응하는 라이트-다운(light-down) 센서 시스템을 추가로 포함하는 분석물 탐지용 키트.

청구항 50

분석물에 대한 압타머의 감도 및 선택성의 측정 방법으로서,

응집체를 상기 분석물과 결합하는 단계;

상기 분석물에 반응한 컬러 변화를 탐지하는 단계로서, 상기 응집체는

DNA 스트랜드를 포함하는 링커; 및

제2 올리고뉴클레오티드에 연결된 제2 입자를 포함하고, 상기 제2 올리고뉴클레오티드가 상기 DNA 스트랜드의 적어도 일부분에 상보적인 것인 단계;

DNA 스트랜드가 구부러져서 컬러 변화를 제공하였는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는 것인 측정 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 응집체가 제1 올리고뉴클레오티드에 연결된 제1 입자를 추가로 포함하고, 상기 제1 올리고뉴클레오티드가 상기 링커의 일부분을 형성하는 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 측정 방법.

청구항 52

청구항 50 또는 청구항 51에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오티드가 상기 확장의 적어도 일부분에 상보적인 것인 측정 방법.

청구항 53

청구항 50 내지 청구항 52 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장은 1 내지 100개의 염기를 포함하고, 상기 염기의 적어도 50%는 제1 또는 제2 올리고뉴클레오티드에 상보적인 것인 측정 방법.

명세서

기술분야

- <1> [연방 정부의 후원을 받은 연구 또는 개발]
- <2> 본 출원의 대상은 하기 연구 보조금 및 계약 하에 일부분 기금이 제공되었다: 미국국립과학재단(National Science Foundation) 계약 번호 CTS-0120978 및 DMR-0117792. 미합중국 정부는 본 발명에 대한 권리를 가질 수 있다.
- <3> [기술분야]
- <4> 샘플 중에서 분석물(analyte)의 존재를 측정하는 능력은 중요한 이익이다. 예를 들어, 많은 금속 및 금속 이온들, 예컨대 납, 수은, 카드뮴, 크롬, 및 비소 등이 식수 공급에 존재하는 경우 심각한 건강 위험을 내포한다. 식수 및 기타 급수(water supply)의 오염을 예방하기 위해서, 수처리 공장에 방출하기 전에 산업 폐기물-스트림을 테스트하는 것이 일반적이다. 생체액(biological fluid), 예컨대 혈액 및 신체 조직으로부터 유래한 것들도, 신체가 유해한 병원체(agent)에 노출되거나, 또는 질환이 존재하는지 여부를 측정하기 위해 다양한 분석물에 대해 테스트될 수 있다. 예를 들어, 다양한 샘플에서 소량의 탄저균을 탐지하기 위한 필요성이 최근 제기되었다.

배경기술

- <5> 토양, 물, 폐기물 스트림, 생물학적 샘플, 생체액 등에서 금속 및 이온의 탐지를 위해 비색법(colorimetric method)이 일반적으로 사용되고 있다. 원자 흡수 분광법(atomic absorption spectroscopy) 등과 같은, 도구에 기반한 분석법과 관련하여, 비색법은 신속하고, 장비 또는 사용자 정교성(sophistication)의 점에서 요구되는 것이 거의 없는 경향이 있다. 예를 들어, 비색 테스트는 어류 연구가에 의해 사용 가능하고, 증가된 질산염(NO_3^-) 이온의 농도를 함유하는 수성 샘플에 첨가되었을 때, 어두운 핑크색으로 변한다. 이와 같이, 비색 테스트는 질산염과 같은, 관심 있는 분석물이 샘플 중에 존재하는지를 나타내고, 또한 생성된 컬러의 특정 색조(hue)를 통해 샘플 중 분석물의 양의 지표를 제공할 수 있다. 종래의 비색 테스트는 매우 유용하지만, 제한된 세트의 분석물에 대해서만 존재하고, 종종 매우 적거나 소량의 분석물을 탐지할 수 없다.
- <6> 상기 기재로부터 알 수 있는 바와 같이, 더 넓은 범주의 분석물의 소량을 확인(identify)할 수 있고, 분석물의 신뢰도를 증가시키는 비색 센서 시스템에 대한 지속적인 요구가 존재한다.

발명의 상세한 설명

- <7> 분석물을 탐지하기 위한 센서 시스템은 상기 분석물에 반응하여 구부러지는 압타머를 포함하는 링커(linker) 및 상기 압타머의 적어도 일부분에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드에 연결된 제2 입자를 포함한다. 상기 링커는 확장(extension)을 포함할 수 있고, 상기 제1 입자에 연결된 제1 올리고뉴클레오티드는 상기 확장의 적어도 일부분에 상보적이다.
- <8> 분석물을 탐지하는 방법은 분석물에 반응한 컬러 변화를 탐지하기 위하여 응집체(aggregate)를 샘플에 결합하는 것을 포함한다. 상기 응집체는 링커 및 제2 입자를 포함할 수 있다. 상기 응집체는 또한 제1 입자를 포함할 수 있고, 상기 링커는 확장을 포함할 수 있다.
- <9> 분석물 탐지용 키트는 분석물에 반응하여 구부러지는 압타머를 포함하는 링크 및 제2 입자를 포함하는 응집체 형성용 시스템을 함유하는 제1 용기를 포함한다. 상기 제2 입자는 상기 압타머의 적어도 일부분에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드에 연결된다.
- <10> 분석물에 대한 압타머의 감도 및 선택성을 측정하기 위한 방법은, 응집체를 상기 분석물과 결합하고, 상기 분석물에 따른 컬러 변화를 탐지하고, DNA 스트랜드가 구부러져서 컬러 변화를 제공하는지의 여부를 측정하는 것을 포함한다. 상기 응집체는 DNA 스트랜드를 포함하는 링커 및 제2 입자를 포함한다. 상기 응집체는 또한 제1 입자를 포함할 수 있다. 상기 링커는 확장을 포함할 수 있다.
- <11> 본 명세서 및 특허청구범위의 명확하고 일관된 이해를 제공하기 위해서, 다음의 정의를 제공한다.
- <12> 용어 "샘플(sample)"은 관심있는 분석물을 함유하는 것으로 추정되어 분석이 행해질 조성물로 정의된다. 통상적으로, 분석용 샘플은 액체 형태이고, 또한 바람직하게는 상기 샘플은 수성 혼합물이다. 샘플은 폐기물 스트림으로부터의 산업적인 샘플 또는 혈액, 소변, 또는 타액과 같은, 생물학적 샘플 등과 같이, 어떠한 기원으로부터도

유래한 것일 수 있다. 샘플은 추출물, 희석물, 여과물, 또는 재구성 침전물과 같은, 산업적 또는 생물학적 샘플의 유도체일 수도 있다.

- <13> 용어 "분석물(analyte)"은 샘플 내에 잠재적으로 존재하는 하나 이상의 물질로 정의된다. 분석은 샘플 내에 존재하는 분석물의 존재, 양, 또는 농도를 측정한다.
- <14> 용어 "비색(colorimetric)"은 센서 시스템을 구성하는 시약(reagent) 또는 시약들이 분석물의 존재 또는 부재시에 컬러 변화를 생성하는 분석으로 정의된다.
- <15> 용어 "라이트-업(light-up)"은 샘플 중에 존재하는 분석물에 반응하여 원하는 컬러 변화를 겪는 비색 센서 시스템을 의미한다.
- <16> 용어 "라이트-다운(light-down)"은 분석물이 샘플 중에 존재하는 경우 컬러 변화를 겪지 않지만, 분석물의 부재시 원하는 컬러 변화가 발생하는 비색 센서 시스템을 의미한다.
- <17> 용어 "감도(sensitivity)"는 센서 시스템에 의해 탐지 가능한 분석물 농도의 최소 증가(해상도(resolution)) 또는 센서 시스템이 배경 신호로부터 분석물에 반응한 신호를 식별할 수 있는 최저 농도 한계(탐지 한계)를 의미한다. 따라서, 센서 시스템이 분석물에 대해 감도가 더 좋을수록, 시스템은 더 낮은 농도의 분석물을 탐지할 수 있다.
- <18> 용어 "선택성(selectivity)"은 다른 종들의 존재 중에 원하는 분석물을 탐지하는 센서 시스템의 능력을 의미한다.
- <19> 용어 "하이브리드화(hybridization)"는 낮은 엄격 조건(low stringency condition) 하에서 하나 이상의 제2 뉴클레오티드와 하나 이상의 수소 결합을 형성하는 제1 폴리뉴클레오티드의 능력을 의미한다.
- <20> 용어 "압타머(aptamer)"는 분석물에 반응하여 입체형태적 변화를 겪는 핵산의 스트랜드를 의미한다.
- <21> 용어 "입체형태적 변화(conformational change)"는 압타머가 다른 상태로부터 3차 구조를 취하는 프로세스를 의미한다. 단순화를 위해, 용어 "구부러짐(fold)"으로 입체형태적 변화를 대용할 수 있다.

실시예

- <42> [상세한 설명]
- <43> 압타머는 핵산 기반 촉매보다 분리하기에 더 쉬울 수 있다. 핵산 효소 대비 압타머의 더 간단한 구조는 또한 핵산 효소로는 불가능한 분석물 센서 시스템의 설계를 가능케 할 수 있다. 본 발명은 올리고뉴클레오티드 기능성 입자 및 압타머의 구부러진 및 구부러지지 않은 입체형태 간의 하이브리드화(hybridization) 길이를 선택함에 의해, 상기 입자가 분석물에 반응하여 방출될 수 있다는 발견을 활용한다. 이러한 방식으로, 실온에서 선택된 분석물에 반응하여 원하는 컬러 변화를 겪는 라이트-업 비색 센서가 제공되고, 그에 따라 미국 특허출원 제 10/144,679에 기재된 센서 시스템의 단점을 극복한다.
- <44> 도 1은 샘플(102) 중 분석물(105)의 존재 및 선택적으로 그 농도를 측정하기 위한 비색분석법(100)을 나타낸다. 110에서, 비색분석법(100)으로 그 존재/농도를 측정할 분석물(105)이 선택된다.
- <45> 한 측면에서, 분석물(105)은 압타머(124)가 구부러지게 할 수 있는 어떠한 이온이라도 가능하다. 다른 측면에서, 분석물(105)은 압타머(124)가 구부러지게 할 수 있는 어떠한 금속 이온이라도 가능하다. ⁺1 형식적 산화 상태(formal oxidation state) (I)을 갖는, 바람직한 1가 금속 이온은 NH⁴⁺, K(I), Li(I), Tl(I), 및 Ag(I)을 포함한다. ⁺2 형식적 산화 상태 (II)를 갖는, 바람직한 2가 금속 이온은 Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Cu(II), Pb(II), Hg(II), Pt(II), Ra(II), Sr(II), Ni(II), 및 Ba(II)를 포함한다. ⁺3 (III), ⁺4 (IV), ⁺5 (V), 또는 ⁺6 (VI) 형식적 산화 상태를 갖는 바람직한 3가 이상의 금속 이온은 Co(III), Cr(III), Ce(IV), As(V), U(VI), Cr(VI) 및 란타넘 원소(lanthanide) 이온을 포함한다. 더욱 바람직한 분석물 이온은 생물에 대해 독성이 있는 금속 이온 및 1가 금속 이온이며, 예로서 Ag(I), Pb(II), Hg(II), U(VI), 및 Cr(VI)을 포함한다.
- <46> 다른 측면에서, 분석물(105)은 압타머(124)가 구부러지게 할 수 있는 어떠한 생체분자라도 가능하다. 바람직한 생체분자는 거대 생체분자, 예를 들어 단백질(예를 들면, HIV, hCG-호르몬, 인슐린과 관련된 단백질), 항체, 성장 인자, 효소, 바이러스(예를 들면, HIV, 천연두), 바이러스 유래 성분(예를 들면, HIV-유래 분자), 박테리아

(예를 들면, 탄저균), 박테리아 유래 분자 및 성분(예를 들면, 탄저균 유래 분자), 또는 세포를 포함한다. 바람직한 생체분자는 또한 작은 생체분자, 예를 들어 아미노산(예를 들면, 아르기닌), 뉴클레오티드(예를 들면, ATP, GTP), 신경전달물질(예를 들면, 도파민), 보조인자(예를 들면, 비오티), 펩티드, 또는 아미노-글리코시드를 포함한다.

- <47> 다른 측면에서, 분석물(105)은 압타머(124)가 구부러지게 할 수 있는 어떠한 유기 분자라도 가능하다. 바람직한 유기 분자로는 약물, 예를 들어 항생제 및 테오필린, 또는 규제 약물, 예를 들어 코카인, 염료, 올리고당, 다당류, 글루코스, 질소 비료, 살충제, 다이옥신, 페놀, 2,4-디클로로페녹시아세트산, 신경 가스, 트리니트로톨루엔(TNT), 또는 디니트로톨루엔(DNT)을 포함한다.
- <48> 일단 분석물(105)이 선택되면, 상기 분석물(105)에 반응하여 구부러지는 하나 이상의 압타머(124)가 선택된다. 압타머 선택(120)은 시험관 내 선택, 지시된 진화(directed evolution), 또는 기술분야의 당업자에게 공지된 다른 방법에 의해 수행될 수 있다. 압타머 선택(120)은 선택된 분석물(105)의 존재 중 향상된 구부러짐을 증명하는 하나 이상의 압타머를 제공할 수 있다(그에 의해 센서 감도를 제공함). 상기 선택(120)은 또한 선택된 분석물의 존재 중에는 구부러지지만, 선택되지 않은 분석물 및/또는 샘플(102) 중 존재하는 다른 종의 존재 중에는 구부러지지 않는 압타머를 배제할 수 있다(그에 의해 선택성을 제공함).
- <49> 예를 들어, Na(I), Li(I), Cs(I), Rb(I), 또는 다른 경쟁적 금속 이온에 유의하게 결합하지 않는 반면, K(I)에 특이적으로 결합하는 압타머가 선택될 수 있다. 한 측면에서, 이는 K(I)에 결합하는 압타머를 분리하고, 이어서 Na(I), Li(I), Cs(I), 또는 Rb(I)에 결합하는 임의의 압타머를 제거함에 의해 달성될 수 있다. 다른 측면에서, Na(I), Li(I), Cs(I), 또는 Rb(I)에 결합하는 압타머를 먼저 제거하고, 이어서 K(I)와 결합하는 압타머가 분리된다. 이런 방식으로, 압타머의 선택성이 증가될 수 있다.
- <50> 압타머(124)는 분석물(105)의 존재 중 구부러지는 핵산 스트랜드를 포함한다. 한 측면에서, 상기 구부러짐은 1차 또는 2차 구조의 3차 구조로의 전환으로 간주될 수 있다. 상기 압타머의 염기 서열은 상기 압타머가 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 기능성 입자와 적어도 부분적인 하이브리드화를 겪을 수 있도록 설계될 수 있다. 이러한 측면에서, 압타머(124)의 염기 서열의 적어도 일부는 상기 올리고뉴클레오티드 기능성 입자의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드에 상보적일 수 있다.
- <51> 압타머(124)는 데옥시리보뉴클레오티드로 형성될 수 있으며, 이는 천연, 비천연, 또는 변형된 핵산이라도 가능하다. 폴리아미드 주쇄(backbone) 및 뉴클레오티드 염기(예를 들어, Bedford, MA 소재의 Biosearch, Inc.로부터 입수 가능)를 포함하는 펩티드 핵산(PNA)도 유용하다.
- <52> 하기 표 1은 분석물, 상기 분석물에 반응하여 구부러지고 또한 이들과 결합하는 압타머 또는 압타머들, 및 각각의 압타머의 서열이 기재되어 있는 참조문헌 또는 참조문헌들에 대한 목록이다. 이들, 및 다른 압타머의 분석물 결합 영역은 링커(128)에서의 사용을 위해 개조될 수 있다. 예를 들어, 하기 표 1에서 서열식별번호 10으로 제공된 코카인 압타머의 비-분석물 결합 영역은 변형되어 압타머 GGGAGACAAGGATAAATCCTTCAATGAAGTGGGTCTCCC(서열식별번호 56)를 제공할 수 있고, 링커(128)에 포함될 수 있다.

표 1

분석물 클래스	예	압타머 모티프 서열(서열식별번호)	참조 문헌
금속 이온	K(I)	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (SEQ ID NO. 1)	1
	Zn(II)	AGGCGAGGUGAAAUGAGCGGUAU AGCCU (SEQ ID NO. 2)	2
	Ni(II)	GGGAGAGGAUACUACACGUGAUAG UCAGGGAACAUGACAAACACAGGG ACUUGCGAAAUCAGUGUUUUGCC AUUGCAUGUAGCAG AAGCUUCCG (SEQ ID NO. 3)	3
유기 염료	시바크론 블루	GGGAGAATTCCCGCGGCAGAAGCCC ACCTGGCTTTGAACTCTATGTTATTGG GTGGGGGAACTTAAGAAACTACC ACCCTTCAACATTACCGCCCTTCAGCC TGCCAGCGCCCTGCAGCCCGGGAAG CTT (SEQ ID NO. 4)	4
		말라카이트 그린	GGAUCCCGACUGGCGAGAGCCAGG UAACGA AUGGAUCC (SEQ ID NO. 5)
	SRB (Sulforhodamine B)	CCGGCCAAGGGTGGGAGGGAGGGG GCCGG (SEQ ID NO. 6)	6

<53>

작은 유기분자	비오틴	AUGGCACCGACCAUAGGCUCGGGU UGCCAGAGGUUCCACACUUUCAUC GAAAAGCCUAUGC (SEQ ID NO. 7)	7
	테오필린	GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUU GGCAGCGUC (SEQ ID NO. 8)	8
	아데닌	GAUAGGACGAUUUAUCGAAAAUCAC CAGAUUGGACCCUGGUU AACGAUC CAUU (SEQ ID NO. 9)	9
	코카인	GGGAGACAAGGATAAATCCTTCAATG AAGTGGGTGACA (SEQ ID NO. 10)	10
	도파민	GGGAAUUCGCGUGUGCGCCGCG GAAGAGGGAAUUAUAGAGGCCAGCA CAUAGUGAGGCCCUCCUCCC (SEQ ID NO. 11)	11
아미노산	아르기닌	GGGAGCUCAGAAUAAACGCUCAAG GAGGACCGUGCACUCCUCGAACAU UUCGAGAUGAGACACGGAUCCUGC (SEQ ID NO. 12)	12
	시트룰린	GACGAGAAGGAGUGCUGGUUAUAC UAGCGGUUAGGUCACUCGUC (SEQ ID NO. 13)	13
뉴클레오시드 및 뉴클레오티드	ATP	ACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAG GT (SEQ ID NO. 14)	14
	cAMP	GGAAGAGAUGGCGACUAAAACGAC UUGUCGC (SEQ ID NO. 15)	15
	GTP	UCUAGCAGUUCAGGUAACCACGUA AGAUACGGGUCUAGA (SEQ ID NO. 16)	16

RNA	구아노신	GGGAGCUCAGAAUAAACGCUCAAC CCGACAGAUCCGGCAACGCCNUGUU UUCGACANGAGACACCGAUCCUGC ACCAAAGCUUCC (SEQ ID NO. 17)	17
	아데노신	ACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAG GT (SEQ ID NO. 18)	18
	TAR-RNA	GCAGTCTCGTGCACCCAGCAGCG CATGTAACCTCCATACATGTGTGTGCT GGATCCGACGCAG (SEQ ID NO. 19)	19
생물학적 보조인자	CoA	GGGCACGAGCGAAGGGCAUAAGCU GACGAAAGUCAGACAAGACAUGGU GCCC (SEQ ID NO. 20)	20
	NMN	GGAACCAACUAGGCGUUUGAGGG GAUUCGGCCACGGUAACAACCCCU C (SEQ ID NO. 21)	21
	FAD	GGCAUAAGGUUUUAAUCCAUA CAAGUUACAAGAAAGAUGCA (SEQ ID NO. 22)	22
아미노- 글리코시드s	포르피린	TAACTAAATGTGGAGGGTGGGACG GGAAGAAGTTTA (SEQ ID NO. 23)	23
	비타민 B12	CCGUGCGCAUAACCACCUCAGUG CGAGCAA (SEQ ID NO. 24)	24
	토브라마이신	GGGAGAAUCCGACCAGAAGCUUU GGUUGUCUUGUACGUUCACUGUU ACGAUUGUGUUAGGUUUAAACUACA CUUUGCAAUCGCAUAUGUGCGUCU ACAUGGAUCCUCA (SEQ ID NO. 25)	25

올리고당	셀로비오스	GCGGGGTTGGGCGGGTGGGTTCGC TGGGCAGGGGGCGAGTG (SEQ ID NO. 26)	26
다당류	세파텍스	UACAGAAUGGGUUGGUAGGCAUAC CUAAUCGAGAAUGAUA (SEQ ID NO. 27)	27
항생제	바이오마이신	GGAGCUCAGCCUUCACUGCAAUGG GCCGCUAGGUUGAUGUGCAGUGA AGUCAGCUGAGGCCAGGGCUGAA AGGAUCGCCCUCCUCGACUCGUGG CACCACGGUCGGAUCCAC (SEQ ID NO. 28)	28
	스트렙토마이신	GGAUCGCAUUUGGACUUCUGCCCA GGGGGCACCACGGUCGGAUCC (SEQ ID NO. 29)	29
	테트라사이클린	GGCCUAAAACAUACCAGAUUUCGA UCUGGAGAGGUGAAGAAUUCGACC ACCUAGGCCGGU (SEQ ID NO. 30)	30
	바소프레신	ACGTGAATGATAGACGTATGTCGAGT TGCTGTGTGCGGATGAACGT (SEQ ID NO. 31)	31
펩티드	P 물질 (Substance P)	GGGAGCUGAGAAUAAACGCUCAAG GGCAACGCGGGCACCCCGACAGGU GCAAAAACGCACCGACGCCCGGCCG AAGAAGGGGAUUCGACAUGAGGCC CGGAUCCGGC (SEQ ID NO. 32)	32
효소	HIV 역전사효소	UCCGUUUUCAGUCGGGAAAACUG (SEQ ID NO. 33)	33
	인간 트롬빈	GGTTGGTGTGGTTGG (SEQ ID NO. 34)	34
성장 인자	VEGF ₁₆₅	GCGGUAGGAAGAAUUGGAAGCCG (SEQ ID NO. 35)	35

전사 인자	NF-κB	GGGAUAUCCUCGAGACAU AAGAAA CAAGAUAGA UCCUGAAACUGUUUU AAGGUUGGCCGAUCUUCUGCUCGA GAAUGCAUGAAGCGU UCCAUAUUU UU (SEQ ID NO. 36)	36
항체	인간 IgE	GGGGCACGTTTATCCGTC CCTCCTAG TGGCGTGCCCC (SEQ ID NO. 37)	37
유전자 제어 인자	연장 인자 Tu	GGGGCUAUUGUGACUCAGCGGUU CGACCCCGCUUAGCUCCACCA (SEQ ID NO. 38)	38
세포 부착 분자	인간 CD4	UGACGUCCUAGAAUUGCGCAUUC CUCACACAGGAUCUU (SEQ ID NO. 39)	39
세포	YPEN-1 내피	ATACCAGCTTATTCAATTAGGCGGTG CATTGTGGTTGGTAGTATACATGAGG TTTGGTTGAGACTAGTCGCAAGATAT AGATAGTAAGTGCAATCT (SEQ ID NO. 40)	40
바이러스성/ 박테리아성 성분	탄저균 포자 라우스 육종 바이러스	서열이 제공되지 않음	41
		AGGACCCUCGAGGGAGGUUGCGCA GGGU (SEQ ID NO. 42)	42

<57>

<58>

표 1에 대한 참조문헌 리스트

1	Ueyama, H., Takagi, M. & Takenaka, S. A novel potassium sensing in aqueous media with a synthetic oligonucleotide derivative. fluorescence resonance energy transfer associated with guanine quartet-potassium ion complex formation. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 124 , 14286-14287 (2002).
2	Ciesiolka, J. & Yarus, M. Small RNA-divalent domains. <i>RNA</i> 2 , 785-793 (1996)

<59>

3	Hofmann, H. P., Limmer, S., Hornung, V. & Sprinzl, M. Ni ²⁺ -binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. <i>RNA</i> 3 , 1289-300. (1997).
4	Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. <i>Nature (London)</i> 346 , 818-22 (1990).
5	Grate, D. & Wilson, C. Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 96 , 6131-6136 (1999).
6	Wilson, C. & Szostak, J. W. Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity. <i>Chemistry & Biology</i> 5 , 609-617 (1998).
7	Wilson, C., Nix, J. & Szostak, J. Functional Requirements for Specific Ligand Recognition by a Biotin-Binding RNA Pseudoknot. <i>Biochemistry</i> 37 , 14410-14419 (1998).
8	Zimmermann, G. R., Wick, C. L., Shields, T. P., Jenison, R. D. & Pardi, A. Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer. <i>Rna</i> 6 , 659-667 (2000).
9	Meli, M., Vergne, J., Decout, J.-L. & Maurel, M.-C. Adenine-aptamer complexes. A bipartite RNA site that binds the adenine nucleic base. <i>J. Biol. Chem.</i> 277 , 2104-2111 (2002).
10	Stojanovic, M. N.; Landry, D. W., Aptamer-Based Colorimetric Probe for Cocaine; <i>J. Am. Chem. Soc.</i> ; 124(33); 9678-9679 (2002).
11	Mannironi, C., Di Nardo, A., Fruscoloni, P. & Tocchini-Valentini, G. P. In vitro selection of dopamine RNA ligands. <i>Biochemistry</i> 36 , 9726-9734 (1997).
12	Connell, G. J., Illangsekare, M. & Yarus, M. Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites. <i>Biochemistry</i> 32 , 5497-502 (1993).
13	Famulok, M. Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 116 , 1698-706 (1994).
14	Sassanfar, M. & Szostak, J. W. An RNA motif that binds ATP. <i>Nature (London)</i> 364 , 550-3 (1993).
15	Koizumi, M. & Breaker, R. R. Molecular Recognition of cAMP by an RNA Aptamer. <i>Biochemistry</i> 39 , 8983-8992 (2000).

<60>

16	Davis, J. H. & Szostak, J. W. Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 99 , 11616-11621 (2002).
17	Connell, G. J. & Yarus, M. RNAs with dual specificity and dual RNAs with similar specificity. <i>Science (Washington, D. C.)</i> 264 , 1137-41 (1994).
18	Huizenga D.E. and Szostak J.W., A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. <i>Biochemistry</i> , 34 , 656-65 (1995).
19	Boiziau, C., Dausse, E., Yurchenko, L. & Toulme, J.-J. DNA aptamers selected against the HIV-1 trans-activation-responsive RNA element form RNA-DNA kissing complexes. <i>J. Biol. Chem.</i> 274 , 12730-12737 (1999).
20	Burke, D. & Hoffman, D. A Novel Acidophilic RNA Motif That Recognizes Coenzyme A. <i>Biochemistry</i> 37 , 4653-4663 (1998).
21	Lauhon, C. T. & Szostak, J. W. RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 117 , 1246-57 (1995).
22	Roychowdhury-Saha, M., Lato, S. M., Shank, E. D. & Burke, D. H. Flavin Recognition by an RNA Aptamer Targeted toward FAD. <i>Biochemistry</i> 41 , 2492-2499 (2002).
23	Chinnapen, D. J. F. & Sen, D. Hemin-Stimulated Docking of Cytochrome c to a Hemin-DNA Aptamer Complex. <i>Biochemistry</i> 41 , 5202-5212 (2002).
24	Lorsch, J. R. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. <i>Biochemistry</i> 33 , 973-82 (1994).
25	Wang, Y., Killian, J., Hamasaki, K. & Rando, R. R. RNA Molecules That Specifically and Stoichiometrically Bind Aminoglycoside Antibiotics with High Affinities. <i>Biochemistry</i> 35 , 12338-12346 (1996).
26	Yang, Q., Goldstein, I. J., Mei, H.-Y. & Engelke, D. R. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 95 , 5462-5467 (1998).
27	Srisawat, C., Goldstein, I. J. & Engelke, D. R. Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures. <i>Nucleic Acids Res.</i> 29 , E4/1-E4/5 (2001).
28	Wallis, M. G. et al. In vitro selection of a viomycin-binding RNA pseudoknot. <i>Chem. Biol.</i> 4 , 357-366 (1997).

<61>

29	Wallace, S. T. & Schroeder, R. In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. <i>Rna</i> 4 , 112-123 (1998).
30	Berens, C., Thain, A. & Schroeder, R. A tetracycline-binding RNA aptamer. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> 9 , 2549-2556 (2001).
31	Williams, K. P. et al. Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 94 , 11285-11290 (1997).
32	Nieuwlandt, D., Wecker, M. & Gold, L. In Vitro Selection of RNA Ligands to Substance P. <i>Biochemistry</i> 34 , 5651-9 (1995).
33	Tuerk, C., MacDougall, S. & Gold, L. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 89 , 6988-92 (1992).
34	Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H. & Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. <i>Nature (London)</i> 355 , 564-6 (1992).
35	Ruckman, J. et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. <i>J. Biol. Chem.</i> 273 , 20556-20567 (1998).
36	Lebruska, L. L. & Maher, L. J., III. Selection and Characterization of an RNA Decoy for Transcription Factor NF- κ B. <i>Biochemistry</i> 38 , 3168-3174 (1999).
37	Wiegand, T. W. et al. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. <i>J. Immunol.</i> 157 , 221-30 (1996).
38	Nazarenko, I. A. & Uhlenbeck, O. C. Defining a Smaller RNA Substrate for Elongation Factor Tu. <i>Biochemistry</i> 34 , 2545-52 (1995).
39	Davis, K. A., Lin, Y., Abrams, B. & Jayasena, S. D. Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. <i>Nucleic Acids Res.</i> 26 , 3915-3924 (1998).
40	Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M. & Schluesener, H. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. Selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. <i>J. Biol. Chem.</i> 276 , 16464-16468 (2001).
41	Bruno, J. G. & Kiel, J. L. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. <i>Biosensors & Bioelectronics</i> 14 , 457-464 (1999).

<62>

42	Pan, W. et al. Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 92 , 11509-13 (1995).
----	--

<63>

<64>

120에서, 적절한 압타머 또는 압타머들을 선택한 후, 압타머(124)를 포함하는 링커(128)가 형성된다. 한 측면에서, 압타머(124)는 직접적으로 링커(128)로서 작용할 수 있다. 다른 측면에서, 링커(128)는 하나 이상의 확장(126)과 압타머(124)를 결합하여 형성될 수 있다.

<65>

확장(126)은 압타머(124)와 결합될 수 있고, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 기능성 입자와 적어도 부분적인 하이브리드화를 겪을 수 있으며, 또한 분석물(100)과 용화가능한 어떠한 핵산 서열이라도 가능하다. 이러한 측면에서, 확장(126)의 염기 서열의 적어도 일부는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 기능성 입자의 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드에 상보적일 수 있다. 한 측면에서, 링커(128)를 형성하기 위하여 고체 상 합성이 사용되어 압타머(124)를 확장(126)과 결합시킬 수 있다. 다른 측면에서, 링커(128)의 압타머(124) 부분이 합성된 후,

확장(126)을 형성하기 위해 합성이 계속된다. 유사하게, 링커(128)는 압타머(124) 서열로 연장될 수 있다.

- <66> 바람직하게는, 확장(126)은 1 내지 100개의 염기를 포함한다. 한 측면에서, 확장(126)에 존재하는 적어도 50, 70, 또는 90%의 염기는, 도 3(a)에서 입자(336)의 TGAGTAGACT-5' (서열식별번호 43) 부분과 같은, 제1 올리고뉴클레오티드 기능성 입자의 상보적인 부분과 가수분해할 수 있는 반면, 상기 확장에 존재하는 적어도 50, 35, 25 또는 10%의 염기는, 도 3(a)에서 입자(337)와 같은, 제2 올리고뉴클레오티드 기능성 입자와 가수분해할 수 있다.
- <67> 링커(128)를 선택 또는 합성한 후, 응집체(132)는 130에서 형성될 수 있다. 응집체(132)는 링커(128) 및 올리고뉴클레오티드 기능성 입자(136)를 포함한다. 그 성분의 물리적 크기와 관련하여, 응집체(132)는 매우 클 수 있다.
- <68> 링커(128)는 올리고뉴클레오티드 기능성 입자(136)와 가수분해하고, 압타머(124)를 포함하며, 확장(126)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 기능성 입자가 각각 3' -AAAAAAAAAATGAGTAGACT (서열식별번호 44) 및 5' -CCCAGGTTCTCT (서열식별번호 45)의 염기 서열을 가지는 경우, 아데노신 분석물 및 확장(126)의 존재 중 구부러지는 압타머(124)를 포함하는 링커(128)에 대한 적절한 서열은 5' -ACTCATCTGTGAAGAGAACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT(서열식별번호 46)일 수 있다.
- <69> 아데노신 분석물에 대하여, 링커(128)의 확장(126) 부분은 상기 서열의 ACTCATCTGTGAAGAGA (서열식별번호 47) 부분이며, 이는 확장(126)이 제1 기능성 입자의 12개의 염기 및 제2 기능성 입자의 5개의 염기와 가수분해되도록 한다. 유사하게, 링커(128)의 압타머(124) 부분은 상기 서열의 ACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT (서열식별번호 18) 부분이며, 이는 압타머(124)의 ACCTGGG(서열식별번호 48) 부분이 제2 기능성 입자의 TGGACCC (서열식별번호 49) 부분과 가수분해되도록 한다.
- <70> 입자(136)는 거리-의존성 광학 특성을 나타내기 때문에, 상기 입자는 응집체(132)와 가까이 있을 때 한가지 컬러이고, 입자들 사이의 거리가 증가함에 따라 컬러 변화를 겪는다. 예를 들어, 입자(136)가 금 나노입자인 경우에, 응집체(132)는 수용액 중에서 청색을 나타내고, 분리가 진행됨에 따라 적색으로 변한다.
- <71> 링커(128)의 압타머(124) 부분이 분석물(105)에 반응하여 구부러지고 이와 결합할 때 분리가 발생한다. 압타머(124)가 구부러질 때, 제2 올리고뉴클레오티드 기능성 입자와 가수분해하는 일부분이 손실된다. 이러한 가수분해 손실은 제2 올리고뉴클레오티드 기능성 입자가 응집체(132)로부터 분리되도록 한다. 그에 따라, 입자(136)가 응집체(132)로부터 방출되면서, 용액은 청색에서 적색으로 변한다.
- <72> 상기 입자(136)는 거리-의존성 광학 특성을 나타내고, 센서 시스템의 작동과 융화가능한 어떠한 종이라도 가능하다. 적절한 입자는 금, 은, 구리, 및 백금과 같은 금속; CdSe, CdS, 및 ZnS로 코팅된 CdS 또는 CdSe와 같은 반도체; 및 Josephson, Lee 등의 *Angewandte Chemie*, International Edition (2001), 40(17), 3204-3206에 기재되어 있는 것과 같은 자성 콜로이드 재료를 포함할 수 있다. 특히 유용한 입자로는 ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs, 및 GaAs를 포함한다.
- <73> 바람직한 측면에서, 상기 입자는 금(Au) 나노입자이고 5 내지 70 나노미터 (nm) 또는 10 내지 50nm의 평균 직경을 갖는다. 더 바람직한 측면에서는, 10 내지 15nm의 평균 직경을 갖는 금 나노입자가 올리고뉴클레오티드로 기능화(functionalized)된다.
- <74> 올리고뉴클레오티드 기능화된 금 입자를 제조하기 위한 더욱 상세한 처리에 대해서는, 미국특허 제6,361,944; Mirkin 등의 *Nature (London)* 1996, 382, 607-609; Storhoff 등의 *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 20, 1959-1064; 및 Storhoff 등의 *Chem. Rev.* (Washington, D. C.) 1999, 99, 1849-1862를 참조한다. 금 나노입자가 현재로서는 바람직하지만, 거리-의존성 컬러 변화를 겪는 다른 종들, 예컨대 무기 결정, 양자 점(quantum dot) 등도 또한 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다.
- <75> 140에서 응집체(132)는 샘플(102)과 결합될 수 있다. 150에서 샘플(102)은 컬러 변화에 대해 모니터된다. 만일 컬러 변화가 발생하지 않은 경우, 분석물(105)은 샘플(102) 내에 존재하지 않는다. 만일 컬러 변화가 160에서 발생한 경우, 분석물(105)은 샘플(102) 내에 존재한다. 컬러 변화는 분석물(105)이 압타머(124)를 구부러지게 하고, 그에 따라 입자(136)가 응집체(136)로부터 샘플(102)의 용액 중으로 방출하게 하였음을 의미한다. 따라서, 분석물(105)의 존재 중 컬러 변화가 발생하기 때문에, 분석법(100)은 "라이트-업(light-up)" 센서 시스템을 제공한다.
- <76> 분석물(105)에 반응하여 실질적으로 완전한 컬러 변화가 발생하는 속도는 센서 시스템의 반응 시간으로 간주될

수 있다. 한 측면에서, 가시 영역에서의 흡수 피크가 20% 증가한 경우, 컬러 변화가 실질적으로 완료된 것으로 간주될 수 있다. 다른 측면에서, 700 nm에 대한 522 nm에서의 흡광 계수(extinction coefficient)가 금 입자에 대하여 100%까지 증가한 경우, 컬러 변화가 실질적으로 완료된 것으로 간주될 수 있다. 센서 시스템에 대한 바람직한 반응 시간은 1초 내지 60분 또는 2초 내지 10분이다. 센서 시스템에 대한 더 바람직한 반응 시간은 5초 내지 2분 또는 8초 내지 12초이다. 센서 시스템의 작동에 바람직한 온도 범위는 0 내지 60°C 또는 15 내지 40°C이다. 센서 시스템의 작동에 더 바람직한 온도 범위는 23 내지 37°C 또는 25 내지 30°C이다. 다른 측면에서, 분석(100)이 23 내지 37°C에서 행해지는 경우, 바람직한 반응 시간은 2분 미만이거나 또는 1 내지 12초가 될 수 있다.

<77> 분석물(105)에 반응한 컬러 변화의 정도는 170에서 기술분야의 당업자에게 공지된 비색정량법(colorimetric quantification method)에 의해 정량될 수 있다. Loveland, CO 소재의 Hach Co. 또는 Chestertown, MD 소재의 LaMotte Co. 등으로부터 입수 가능한 것과 같은, 다양한 컬러 비교측정 휠(color comparator wheel)이 본 발명과 함께 사용을 위해 적용될 수 있다. 비교의 정확성을 증가시키기 위해서 테스트 샘플에 더하여, 알려진 양의 선택된 분석물을 함유하는 표준이 분석될 수 있다. 더 높은 정밀도가 요구되는 경우, 다양한 타입의 분광광도계를 사용하여 원하는 농도 범위에서 비어 곡선(Beer's curve)을 플롯할 수 있다. 이어서 상기 샘플의 컬러를 상기 곡선과 비교하고, 상기 샘플에 존재하는 분석물의 농도를 측정할 수 있다. 적절한 분광광도계는 Hewlett-Packard 8453 및 Bausch & Lomb Spec-20을 포함한다.

<78> 다른 추가의 측면에서, 분석물(105)에 대한 압타머의 감도 및 선택성을 측정하기 위해 상기 방법(100)이 변형될 수 있다. 이런 측면에서, 분석물(106)에 반응한 압타머인 것으로 추측되는 하나 이상의 DNA 스트랜드가 120에서 선택된다. 125에서 DNA 스트랜드는 확장(126)으로 변형될 수 있거나 또는 변형될 수 없다. 130에서, 응집체는 DNA 스트랜드 및 적절한 입자로부터 형성된다. 140에서, 상기 응집체는 분석물(105)과 결합된다. 만일 상기 응집체가 컬러 변화를 겪는 경우, DNA 스트랜드는 타겟(105)에 대한 적절한 압타머 서열이다. 이러한 방식으로, 120에서 선택된 복수의 압타머는 비색 센서 시스템에서의 사용을 위해 테스트될 수 있다.

<79> 도 2(a)는 구부러진 구조(230)를 취하기 위하여 입체형태적 변화를 겪는 두 개의 분석물 분자에 의존하는 압타머(224)를 도시한다. 도 2(b)는 두 개의 아데노신 분자에 반응하여 구부러진 구조(230)를 형성하는 압타머(224)의 특이적 염기 쌍을 도시한다. 이러한 특이적 압타머 서열은 아데노신 분석물의 2개의 분자에 의존하여 구부러지는 반면, 다른 압타머는 단일 분석물 분자에 반응하여 구부러질 수 있다.

<80> 도 2(c)는 확장(226)에 연결된 압타머(224)가 링커(228)를 형성하는 것을 도시한다. 확장(226)은 A 및 B 부분을 포함하며, 여기서 A 부분은 제1 입자(236)의 올리고뉴클레오티드와 안정한 하이브리드화를 형성하기 위한 충분한 상보성 염기를 포함한다. 예를 들어, 12개의 아데닌 염기를 포함하는 비-상보성 폴리아데닌 사슬(A₁₂)은 제1 입자(236)의 상보성 서열에 부가되어 하이브리드화 안정성을 향상시킬 수 있다. 확장(226)의 B 부분에 대한 서열은 안정한 2차 구조를 고유적으로 형성하는 링커를 제거하도록 선택될 수 있다. 제거용으로 안정한 링커를 예측하기 위하여, (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>)(M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids Res.* 31 (13), 3406-15, (2003))에서 입수 가능한 M-폴드(M-fold)와 같은 컴퓨터 프로그램이 사용될 수 있다. 예를 들어 링커에 대한 안정한 서열이 ACTCATCTGTGAAGAGACCTGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT(서열식별번호 50)인 경우, 밀줄친 TG염기를 GA 염기로 치환하여 서열 ACTCATCTGTGAAGAGACCTGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT(서열식별번호 51)를 얻음으로서, 상기 링커가 고유적으로 불안정한 것이 되게 할 수 있다.

<81> 압타머(224)는 C 및 D 부분을 포함한다. 한 측면에서, 제2 입자(237)와 결합된 확장(226)의 B 부분 및 압타머(224)의 C 부분의 하이브리드화 안정성은 제1 입자(236) 및 A에 대한 것보다 작을 수 있다. 바람직한 측면에서, 이러한 C+B/제2 입자 하이브리드화의 용해 온도는 센서 시스템이 사용될 온도보다 더 높다. 다른 바람직한 측면에서, 제2 입자(237)의 올리고뉴클레오티드 서열에 하이브리드화된 B 부분의 용해 온도는 센서 시스템이 사용될 온도 미만이다. 다른 바람직한 측면에서, C + B + 분석물 복합체의 안정성은 제2 입자(237)와 C의 하이브리드화 안정성보다 더 크다. 다른 측면에서, B 및 C의 서열은 센서 시스템의 작동과 용화가 가능할 정도로 짧다.

<82> 도 3(a)는 아데노신 분석물(305)의 존재 중 응집체(332)의 분리(disaggregation)를 나타낸다. 응집체(332)는 복수의 응집체 단위(331)로 형성된다. 각각의 응집체 단위(331)는 링커(328)로 형성되며, 이는 3' 및 5' 티올-올리고뉴클레오티드 기능성 입자(336 및 337)에, 각각 하이브리드화된다. 링커(328)는 압타머 부분(324) 및 확장 부분(326) 부분을 포함한다. 3' -A₁₂Ade_{Au} 입자(336)는 확장(326)과 하이브리드화하는 반면, 5' -Ade_{Au} 입자

(337)는 확장(326) 및 압타머(324)와 하이브리드화하여 응집체 단위(331)를 형성한다.

- <83> 입자 및 링커에 대한 하나의 염기 서열이 도시되었지만, 짝짓기(pairing)를 유지하기 위해 상기 염기는 반대쪽 스트랜드 상에서 변경될 수 있다. 예를 들어, 상기 입자 올리고뉴클레오티드의 짝지은 염기가 구아닌에서 아데닌으로 변경되는 한, 링커(228)의 A 또는 B 부분에 있는 어떠한 시토신도 티민으로 변경될 수 있다.
- <84> 아데노신 분석물(305)의 존재 중, 링커(328)의 압타머 부분(324)은 구부러지고, 그에 따라 5' -Ade_{Au} 입자(337) 및 링커(328)의 압타머 부분(324) 간의 하이브리드화의 적어도 일부가 제거된다. 5' -Ade_{Au} 입자(337) 및 압타머(324) 간의 하이브리드화의 이러한 손실은 5' -Ade_{Au} 입자(337)를 용액으로 방출한다.
- <85> 5' -Ade_{Au} 입자(337)가 방출됨에 따라, 청색 응집체(332)가 분리되기 시작하여 부분적인 응집체(390)를 형성한다. 입자(337)가 응집체(332)로부터 방출함에 따른 이러한 부분적인 분리는 청색 용액에 적색 컬러를 가하며, 그에 따라 자줏빛의 용액을 얻는다. 만일 충분한 아데노신 분석물(305)이 샘플에 존재하는 경우, 응집체(332)가 완전히 분리될 때까지 반응은 계속되어, 395를 얻는다. 완전한 분리는 입자(336,337) 간의 더 큰 거리에 기인한 적색 용액을 가져온다.
- <86> 서로에 관한 입자(336,337)의 정렬(테일-투-테일, 헤드-투-테일 또는 헤드-투-헤드)은 응집체 단위(331)가 얼마나 강하게 결합하는지에 영향을 미칠 수 있다. 도 3(b)는 336 및 337과 같은 기능성 입자가 테일-투-테일 배열로 링커(328)에 하이브리드화될 때 형성된 응집체 단위(331)를 도시한다. 헤드-투-테일(도 3(c) 또는 헤드-투-헤드(도 3(d)) 하이브리드화는, 각각 상기 입자가 부착되는 올리고뉴클레오티드의 하나 또는 양쪽 끝을 역으로 하여 선택될 수 있다. 그에 따라, 5'에 대한 기능성 입자(336)의 3' 부착을 역으로 하여, 입자(338)가 하이브리드하여 도 3(c)의 헤드-투-테일 정렬을 얻을 수 있다. 이와 유사하게, 입자(338)의 5' 부착에 대한 기능성 입자(336)의 3' 부착을 역으로 하고, 또한 입자(339)의 3' 부착에 대한 입자(337)의 5' 부착을 역으로 하여, 입자(338,339)가 하이브리드하여 도 3(d)의 헤드-투-헤드 정렬을 얻을 수 있다.
- <87> 현재, 도 3(b)의 테일-투-테일 하이브리드화 배열이 바람직하는데, 그 이유는 도 3(c) 및 도 3(d)의 헤드-투-테일 또는 헤드-투-헤드 하이브리드화 배열이 압타머 결합 및/또는 응집체 형성을 입체적으로(sterically) 방해하는 응집체를 생성할 수 있기 때문이다. 그러나, 이러한 입체 방해(steric hindrance)는 예를 들어, 상기 입자의 평균 직경의 감소를 통해 또는 확장의 길이 및 상기 입자에 기능성화된 염기의 수의 증가에 의해 감소될 수 있다.
- <88> 도시되지는 않았지만, 도 3(a)의 방법론은 상기 표 1에 나열된 분석물, 코카인 및 칼륨 이온을 포함하는, 다른 분석물에 적용될 수 있다. 하기 표 2는 아데노신, K(I), 및 코카인 센서 시스템에 대한 입자 및 링커의 염기 서열을 제공한다. 각각의 링커의 압타머 부분은 대문자로 나타낸 반면, 각각의 링커의 확장 부분은 소문자로 나타낸다.

표 2

명칭	서열	서열 식별 번호
아데노신 링커	5'-actcatctgtgaagagaACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT	46
3'-A ₁₂ Ade _{Au}	3'-AAAAAAAAAAAAATGAGTAGACT	44
5'-Ade _{Au}	5'-CCCAGGTTCTCT	45
칼륨 링커	5'-actcatctgtgatctaaGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	52
3'-A ₁₂ K(I) _{Au}	3'-AAAAAAAAAAAAATGAGTAGACT	44
5'-K(I) _{Au}	5'-AACCCCTTAGA	53
코카인 링커	5'-actcatctgtgaatctc GGGAGACAAGGATAAATCCTTCAATGAAGTGGGTCTCCC	54
3'-A ₁₂ CoCAu	3'-AAAAAAAAAAAAATGAGTAGACT	44
5'-CoCAu	5'-GTCTCCCGAGA	55

<89>

- <90> 샘플의 이온 강도는 응집체를 형성하는 모이어티가 서로 얼마나 강하게 결합하는지에 영향을 미칠 수 있다. 더 높은 염 농도는 응집을 촉진하여, 센서 반응을 느리게 하는 반면, 더 낮은 염 농도는 응집체를 유지하기 위해 필요한 이온 강도가 부족할 수 있다. 한 측면에서, 30mM 이상의 1가 금속 이온 농도를 포함하기 위해서 샘플은 시약(reagent)을 포함하거나 또는 시약으로 변형될 수 있다. 샘플의 이온 강도는 예를 들어, Na^+ 이온으로 변형될 수 있다. 바람직한 측면에서, 응집체를 함유하는 샘플의 1가 금속 이온 농도는 150 내지 400mM이다. 현재, 특히 바람직한 1가 금속 이온 농도는, 아데노신 및 칼륨 분석물에 대해서 약 300mM이고, 분석물로서 코카인에 대해서 약 150mM이다. pH 또한 응집체 결합에 영향을 미칠 수 있는데, 이는 아마도 낮은 pH에서 폴리뉴클레오티드 염기 쌍들의 양성자부가(protonation)에 기인한다. 한 측면에서, 5 내지 9의 pH가 바람직하며, 대략 중성의 pH가 더욱 바람직하다.
- <91> 따라서, 응집체와 결합하기 전에 샘플의 pH 및 이온 강도를 조정함으로써 센서의 성능이 향상될 수 있다. 샘플에 따라서, 샘플 또는 분석물을 (이온 강도 및 pH가 조절될 수 있는) 응집체를 함유하는 용액에 가하거나, 또는 그 반대로 하는 것이 바람직할 수도 있다.
- <92> 압타머, 확장, 및 올리고뉴클레오티드 기능성 입자를 포함하는 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 한 측면에서, 키트는 링커를 형성하기 위하여 연결된 확장 및 압타머를 포함한다. 다른 추가의 측면에서, 키트는 확장을 포함하지만, 압타머를 배제하며, 이는 이어서 사용자에게 의해 제공되거나 개별적으로 제공된다. 이러한 측면에서, 키트는 또한 선택된 분석물에 대한 다양한 압타머의 선택성 및/또는 특이성을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 키트는 분석물을 탐지하는 것 외에도 적절한 압타머를 선택하기 위해 사용될 수 있다. 다른 추가의 측면에서, 키트는 링커 및 올리고뉴클레오티드 기능성 입자를 동봉한 외부 패키지를 포함한다.
- <93> 하나 이상의 이러한 키트 구성 요소들은 개별적인 용기로 분리되거나, 또는 그들의 응집된 상태로 제공될 수 있다. 만일 분리된 경우, 응집체는 샘플을 도입하기 전에 형성될 수 있다. 샘플의 이온 강도 및/또는 pH를 조정하기 위해서 추가의 버퍼 및/또는 pH 조절제가 키트에 제공될 수 있다.
- <94> 용기는 병, 튜브(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며, 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 마이라(MYLAR[®]), 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 주사 바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 한 측면에서, 외부 패키지는 종이 또는 플라스틱으로 만들어질 수 있는 반면, 용기는 유리 앰플이다.
- <95> 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서(instructions)를 포함할 수 있다. 컬러 비교측정기(comparator); 분석물의 10 μm 용액과 같은 표준 분석물 용액; 및 박층 크로마토그래피(TLC) 플레이트, 테스트 튜브, 및 큐벳과 같은 시각화 보조기구도 또한 포함될 수 있다. 혼합을 위해서 제거될 수 있는 막에 의해 분리된 둘 이상의 구획을 갖는 용기가 포함될 수 있다. 외부 패키지는 또한 분석용 샘플을 제조할 수 있게 하는 희석 시약 및 필터를 포함할 수 있다.
- <96> 다른 측면에서, 본 발명의 센서 시스템에 더하여, 키트는 또한 분석물 측정의 신뢰성을 더욱 증가시키고, 사용자 에러의 가능성을 감소시키기 위한 복수의 센서 시스템을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명에 따른 복수의 라이트-업 센서 시스템이 포함될 수도 있다. 다른 측면에서, "라이트-다운(light-down)" 센서 시스템이 본 발명의 라이트-업 센서 시스템과 함께 포함될 수 있다. 본 발명에서 청구된 키트에 포함되기 위한 적절한 라이트-다운 센서는 선택된 분석물의 존재 하에서 형성되지 않는 DNA효소/기질/입자 응집체에 의존할 수 있다. 본 발명에서 청구된 키트에 포함되기 위한 적절한 라이트-다운 센서 시스템의 더욱 상세한 설명은, 예를 들어 본 명세서에 인용에 의해 도입된, 발명의 명칭이 "유도된 입자 어셈블리를 기반으로 하는 바이오센서"인 2004년 1월 13일자로 출원된 미국 특허 출원 제10/756,825에 기재되어 있다.
- <97> 진술한 기재들은 기재된 구현으로 본 발명의 범주를 제한하려는 의도가 아니라, 기술분야에서의 당업자로 하여금 본 발명을 실시가능하게 하는 것이다. 이와 유사하게, 하기 실시예들은 첨부한 특허청구범위 또는 이에 상당하는 것들의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 단지 예시를 위해 제공된다. 많은 변형들이 하기 절차에 대해 행해질 수 있으며, 이들은 첨부한 특허청구범위 또는 이에 상당하는 것들의 범주 내에 있는 것으로 이해될 것이다.
- <98> [실시예]

- <99> 모든 DNA 샘플들은 Coralville, IA 소재의 Integrated DNA Technology Inc.로부터 구매하였다. 확장을 형성하는 DNA 샘플은 겔 전기영동에 의해 정제하였고, 올리고뉴클레오티드 기능성 입자를 형성하기 위한 티올-변형된 DNA 샘플은 표준의 탈염(desalting)으로 정제하였다. 아데노신, 시티딘, 우리딘, 구아노신 및 코카인은 Aldrich로부터 구매하였다. 13nm의 평균 직경을 갖는 금 나노입자를 제조하고, 예를 들어, Storhoff, J.등의 "One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold particle probes" *JACS* 120: 1959-1964(1998)에 기재되어 있는 것과 같은, 문헌에 기재된 절차에 따라 12-mer 티올-변형된 DNA로 기능화하였다. 금 나노입자의 평균 직경은 투과 전자 현미경(JEOL 2010)으로 확인하였다.
- <100> 실시예 1 : 비색 아데노신 센서의 제조
- <101> 500 마이크로리터의 5'-Ade_{Au} (522nm에서 흡광은 2.2) 및 500 μ l의 3'-A₁₂Ade_{Au} (522nm에서 흡광은 2.2)를 300 mM NaCl, 25 mM 트리스 아세테이트 버퍼, pH 8.2, 및 100 nM의 아데노신 압타머/확장 (아데노신 링커) 존재 중 혼합하였다. 상기 샘플을 1분 동안 65°C로 가열하고, 이어서 4°C까지 서서히 냉각하였다. 나노입자는 이러한 프로세스 중 적색에서 진보라색으로 컬러가 변화하였다. 상기 샘플을 원심분리하고 침전물을 수집하고 이어서 동일한 버퍼(300 mM NaCl, 25 mM 트리스 아세테이트, pH 8.2) 2000 mL에 분산시켰다. 부유액을 아데노신 탐지용으로 사용하였다.
- <102> 실시예 2: 아데노신의 비색 탐지
- <103> 실시예 1로부터의 센서 부유액 100 마이크로리터를 소량의 농축된 아데노신 용액에 가하였다. 예를 들어, 2 μ l의 50 mM 아데노신을 가하여 1 mM의 최종 농도를 얻었다. 컬러 변화를 UV-vis 분광계 또는 육안으로 모니터링하였다.
- <104> 실시예 3: 아데노신 센서의 성능 모니터링
- <105> 실시예 2로부터의 샘플의 컬러 변화를 UV-vis 흡광 분광법으로 모니터링하였다. 도 4는 분리 중 샘플로부터 특정 파장에서 제공된 흡광비와 관련한 그래프이다. 도 4의 파선은 분리된 13 nm 나노입자에 의해 나타나는 522 nm에서의 강력한 흡광 피크를 나타내며, 이는 진한 적색을 제공한다. 도 4의 실선으로부터 볼 수 있는 바와 같이, 응집하자마자, 522nm 피크는 강도가 감소하고, 더 긴 파장으로 이동하는 반면, 700nm 영역에서의 흡광은 증가하여, 적색에서 청색으로의 컬러 전이(transition)를 가져온다. 그러므로 522nm 내지 700nm에서의 더 높은 흡광비는 분리된 나노입자의 적색 컬러와 관련된 반면, 낮은 흡광비는 응집된 나노입자의 청색 컬러와 관련되어 있다. 입자의 응집 상태를 모니터링하기 위해 이러한 흡광비를 사용하였다.
- <106> 실시예 4: 아데노신 센서의 감도 및 선택성
- <107> 석영 UV-vis 분광광도계 셀(Hellma, Germany)에 실시예 1에서 제조된 아데노신 센서 시스템 100 μ l를 가하였다. 아데노신, 우리딘, 시티딘 또는 구아노신을 함유하는 용액의 소량(1-5 μ l)을 분광광도계 셀에 가하고, 상기 셀에 원하는 수준으로 분석물을 농축시켰다.
- <108> Hewlett-Packard 8453 분광광도계를 사용하여 시간의 함수로 각각의 셀에 대한 분산 동역학을 모니터링하였다. 도 5(a)는 시간의 함수로 플롯된 522 및 700nm에서 흡광비를 도시한 그래프이다. 상기 플롯으로부터 알 수 있는 바와 같이, 아데노신만이 시간의 함수로 흡광비에서의 유의한 증가를 가져온 반면, 우리딘, 시티딘, 및 구아노신은 배경(background)과 부합하는 컬러 변화를 제공하였다. 그러므로, 센서의 높은 선택성을 확인하였다.
- <109> 도 5(b)는 응집 5분 후 아데노신 분석물의 농도 및 센서 시스템의 컬러 변화에 대해 관찰된 흡광비 사이의 상관관계를 도시한 그래프이다. 센서 시스템의 예외적인 직선성(linearity)은 약 0.1 내지 약 1.5mM에서 명백했다.
- <110> 도 5(c)는 6분의 시간 동안 복수의 아데노신 분석물 농도에 대한 흡광비를 나타낸 그래프이다. 상기 그래프는 몇 분(a few minutes) 내에 상이한 분석물 농도 간을 효과적으로 식별하기 위한 센서 시스템의 능력을 증명한다. 그에 따라, 정확한 정량 정보를 제공하기 위한 센서 시스템의 능력을 입증하였다.
- <111> 도 5(b)의 도구적 방법에 더하여, 센서에 의해 발현된(developed) 컬러는 시각적으로 용이하게 관찰될 수 있다. 아데노신의 농도가 0에서 2mM로 증가함에 따라 청색에서 적색으로의 컬러의 진행(progression)이 관찰되었다. 우리딘, 시티딘, 및 구아노스(guanos)는 배경과 유사한 컬러를 제공하였다.
- <112> 실시예 5: 비색 칼륨 이온 센서의 제조
- <113> 도 6(a) 내지 도 6(b)는 K(I)의 존재 중 구부러지는 압타머를 포함하는 분석물 센서 시스템을 나타낸다. 도

6(a)는 올리고뉴클레오티드 기능성 입자 및 링커의 압타머 부분 및 확장의 서열을 제공한다. 도 6(b)는 K(I) 분석물의 존재 중 압타머 구부러짐을 도시한다. K(I) 센서 시스템을 제조하기 위하여, 500 μl 의 5'-K(I)_{Au} (522nm에서 흡광은 2.2) 및 500 μl 의 3'-A₁₂K(I)_{Au} (522nm에서 흡광은 2.2)를 300 mM NaCl, 25 mM 트리스 아세테이트 버퍼, pH 8.2, 및 100 nM의 칼륨 이온 압타머/확장 (칼륨 링커) 존재 중 혼합하였다. 상기 샘플을 1분 동안 65 °C로 가열하고, 이어서 4°C까지 서서히 냉각하였다. 나노입자는 이러한 프로세스 중 적색에서 진보라색으로 컬러가 변화하였다. 상기 샘플을 원심분리하고 침전물을 수집하고 이어서 동일한 버퍼(300 mM NaCl, 25 mM 트리스 아세테이트, pH 8.2) 10 μl 에 분산시켰다. 부유액을 K⁺ 탐지용으로 사용하였다.

<114> 실시예 6: 칼륨의 비색 탐지

<115> 탈이온수 중에서, LiCl, NaCl, KCl, RbCl 또는 CsCl 염을 각각 용해하여 Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, 또는 Cs⁺ 이온의 금속 이온 용액을 만들어 3M의 이온 농도를 얻었다. 이러한 금속 이온 원액으로부터 25 mM의 트리스 아세테이트 버퍼, pH 8.2, 및 300 mM의 Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, 또는 Cs⁺ 이온을 함유하는 용액을 제조하였다. 이러한 5개 용액의 각각에, 금속 이온 함유 용액의 각 99 μl 에 대하여 실시예 5로부터의 K(I) 센서 시스템 1 μl 를 가하였다. 그러므로, 각각의 용액은 ~300 mM의 Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, 또는 Cs⁺ 금속 이온과 배경으로서 추가적인 3 mM의 Na⁺ 이온을 함유한다. 각각의 샘플을 65°C로 가열하고, 이어서 1시간 동안 4°C까지 서서히 냉각하였다. 컬러 변화를 UV-vis 분광계 또는 육안으로 모니터링하였다. 도 6(c)는 Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, 또는 Cs⁺ 이온의 존재 중 칼륨 이온 센서 시스템의 흡광비를 도시하며, 그에 따라 K(I)에 대한 센서 시스템의 선택성을 확인한다.

<116> 실시예 7: 비색 코카인 센서의 제조

<117> 도 7(a) 내지 도 7(b)는 코카인의 존재 중 구부러지는 압타머를 포함하는 분석물 센서 시스템을 나타낸다. 도 7(a)는 올리고뉴클레오티드 기능성 입자 및 링커의 압타머 부분 및 확장의 서열을 제공한다. 도 7(b)는 코카인 분석물의 존재 중 압타머 구부러짐을 도시한다. 코카인 센서 시스템을 제조하기 위하여, 500 μl 의 5'-Coc_{Au} (522nm에서 흡광은 2.2) 및 500 μl 의 3'-A₁₂Coc_{Au} (522nm에서 흡광은 2.2)를 300 mM NaCl, 25 mM 트리스 아세테이트 버퍼, pH 8.2, 및 100 nM의 코카인 압타머/확장 (코카인 링커) 존재 중 혼합하였다. 상기 샘플을 1분 동안 65°C로 가열하고, 이어서 4°C까지 서서히 냉각하였다. 나노입자는 이러한 프로세스 중 적색에서 진보라색으로 컬러가 변화하였다. 상기 샘플을 원심분리하고 침전물을 수집하였다. 이어서 수집된 침전물을 또다른 버퍼(150 mM NaCl, 25 mM 트리스 아세테이트, pH 8.2) 2000 μl 에 분산시켰다. 부유액을 코카인 탐지용으로 사용하였다.

<118> 실시예 8: 코카인의 비색 탐지

<119> 상기로부터 제조된 코카인 센서 부유액 100 마이크로리터를 소량의 농축된 코카인 용액과 결합하였다. 예를 들어, 1 μl 의 100 mM 코카인을 상기 부유액에 가하여 1 mM의 최종 농도를 얻었다. 컬러 변화를 UV-vis 분광계 또는 육안으로 모니터링하였다.

<120> 실시예 9: 코카인 센서의 감도 및 선택성

<121> 석영 UV-vis 분광광도계 셀(Hellma, Germany)에 실시예 7에서 제조된 코카인 센서 시스템 100 μl 를 가하였다. 코카인, 아데노신, 또는 수크로오스를 포함하는 용액의 소량(0.5-2 μl)을 분광광도계 셀에 가하고, 상기 셀에 원하는 수준으로 분석물을 농축시켰다.

<122> Hewlett-Packard 8453 분광광도계를 사용하여 시간의 함수로 각각의 셀에 대한 분산 동역학을 모니터링하였다. 도 8(a)는 시간의 함수로 플롯된 522 및 700nm에서 흡광비를 도시한 그래프이다. 상기 플롯으로부터 알 수 있는 바와 같이, 코카인만이 시간의 함수로 흡광비에서의 유의한 증가를 가져온 반면, 아데노신 및 수크로오스는 배경과 부합하는 컬러 변화를 제공하였다. 그러므로, 센서의 높은 선택성을 확인하였다.

<123> 도 8(b)는 응집 1분 후 코카인 분석물의 농도 및 센서 시스템의 컬러 변화에 대해 관찰된 흡광비 사이의 상관관계를 도시한 그래프이다. 센서 시스템의 예외적인 직선성은 약 0.1 내지 약 1 mM에서 명백했다.

<124> 도 8(c)는 5분의 시간 동안 복수의 코카인 분석물 농도에 대한 흡광비를 나타낸 그래프이다. 상기 그래프는 몇 분(a few minutes) 내에 상이한 분석물 농도 간을 효과적으로 식별하기 위한 센서 시스템의 능력을 증명한다. 그에 따라, 정확한 정량 정보를 제공하기 위한 센서 시스템의 능력을 입증하였다.

<125> 도 8(b)의 도구적 방법에 더하여, 센서에 의해 발현된 컬러는 시각적으로 용이하게 관찰될 수 있다. 코카인의

농도가 0에서 1 mM로 증가함에 따라 청색에서 적색으로의 컬러의 진행(progression)이 관찰되었다. 아데닌 및 수크로오스는 배경과 유사한 컬러를 제공하였다.

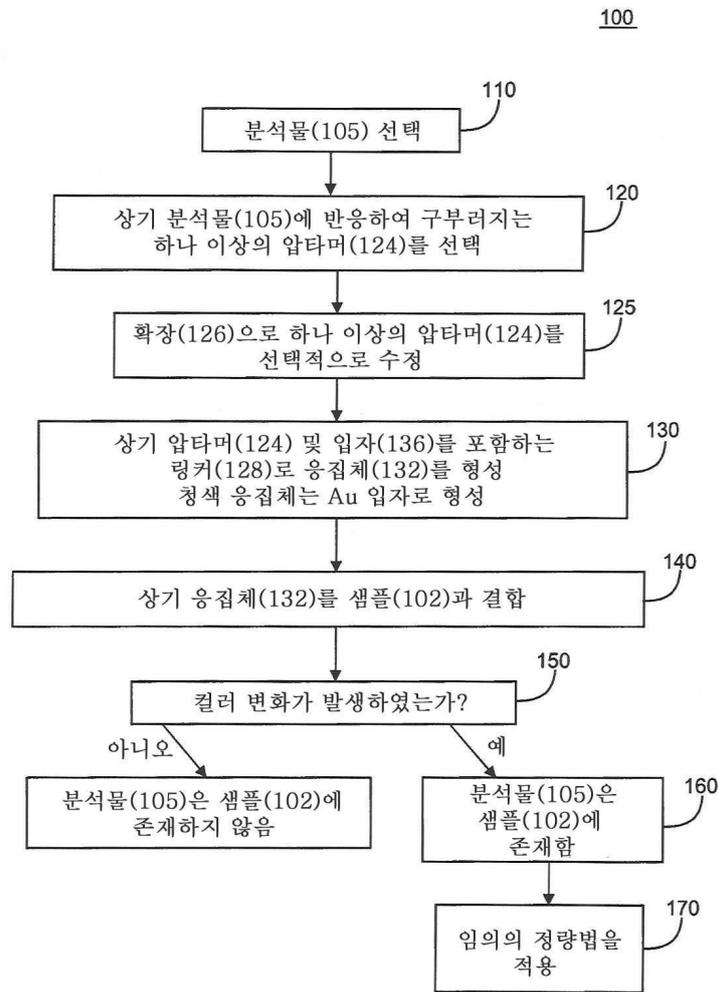
<126> 기술분야에서의 당업자는 제공된 상세한 설명, 도면, 및 실시예들로부터, 하기 특허청구범위 및 이에 상당하는 것에 의해 정의된 본 발명의 범위를 벗어나지 않고, 본 발명의 바람직한 구현예에 대해서 변형 및 변경이 행해 질 수 있음을 인지할 것이다.

도면의 간단한 설명

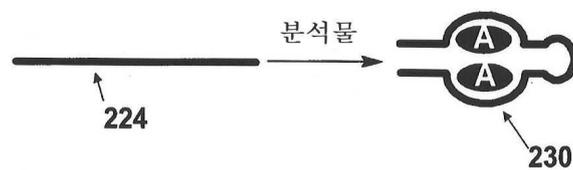
- <22> 본 발명은 하기 도면 및 상세한 설명을 참조하여 더욱 잘 이해될 것이다. 도면 중의 구성 요소는 반드시 크기를 정할 필요는 없으며, 분자 또는 그들의 상호작용을 정확하게 표현하려는 것이 아니라, 본 발명의 원리를 설명하는 것에 중점을 둔 것이다.
- <23> 도 1은 샘플 중 분석물의 존재 및 선택적으로 그 농도를 측정하기 위한 비색분석법을 나타낸다.
- <24> 도 2(a)는 두 개의 분석물 분자가 구부러지는 것에 의존하는 압타머를 도시한다.
- <25> 도 2(b)는 두 개의 아데노신 분자가 구부러지는 것에 의존하는 압타머에 대한 염기 쌍을 도시한다.
- <26> 도 3(a)는 아데노신 분석물의 존재 중 응집체의 분리(disaggregation)를 나타낸다.
- <27> 도 3(b)는 올리고뉴클레오티드 기능성(functionalized) 입자와 링커의 테일-투-테일 하이브리드화(tail-to-tail hybridization)를 나타낸다.
- <28> 도 3(c)는 올리고뉴클레오티드 기능성 입자와 링커의 헤드-투-테일 하이브리드화(head-to-tail hybridization)를 나타낸다.
- <29> 도 3(d)는 올리고뉴클레오티드 기능성 입자와 링커의 헤드-투-헤드 하이브리드화(head-to-head hybridization)를 나타낸다.
- <30> 도 4는 응집(실선) 및 분리된(파선) 금 나노입자에 의해 샘플로부터 방출된 빛의 파장에 대한 흡광비(extinction ratio)와 관련한 그래프이다.
- <31> 도 5(a)는 구아노신(○), 시티딘(▲), 우리딘(□) 및 아데노신(●) 함유 샘플에 대한 시간에 따른 흡광비의 변화를 나타낸 그래프이다.
- <32> 도 5(b)는 1분 후 아데노신 분석물의 농도 및 센서 시스템의 컬러 변화에 대해 관찰된 흡광비 사이의 상관관계를 도시한 그래프이다.
- <33> 도 5(c)는 6분이 지난 후 복수의 아데노신 농도에 대한 흡광비를 도시한 그래프이다.
- <34> 도 6(a)는 칼륨 이온 센서 시스템에 대한 올리고뉴클레오티드 기능성 입자 및 링커의 압타머 부분 및 확장(extension)의 서열을 제공한다.
- <35> 도 6(b)는 K(I) 분석물의 존재 중 압타머 구부러짐을 도시한다.
- <36> 도 6(c)는 복수의 금속 이온에 대한 칼륨 이온 센서의 흡광비를 도시한다.
- <37> 도 7(a)는 코카인 센서 시스템에 대한 올리고뉴클레오티드 기능성 입자 및 링커의 압타머 부분 및 확장의 서열을 제공한다.
- <38> 도 7(b)는 코카인 분석물의 존재 중 압타머 구부러짐을 도시한다.
- <39> 도 8(a)는 아데노신(△), 수크로오스(○), 및 코카인(●) 함유 샘플에 대한 시간에 따른 흡광비의 변화를 나타낸 그래프이다.
- <40> 도 8(b)는 응집 1분 후 코카인 분석물의 농도 및 센서 시스템의 컬러 변화에 대해 관찰된 흡광비 사이의 상관관계를 도시한 그래프이다.
- <41> 도 8(c)는 5분이 지난 후 복수의 코카인 분석물 농도에 대한 흡광비를 도시한 그래프이다.

도면

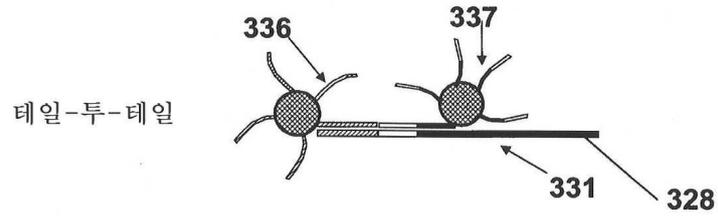
도면1



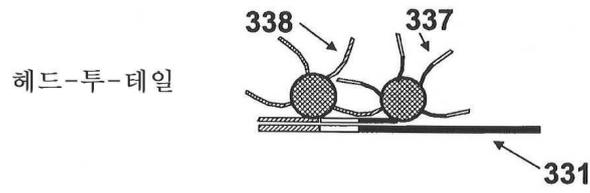
도면2a



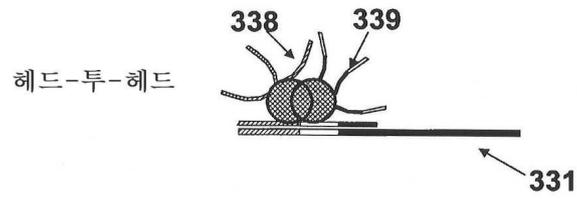
도면3b



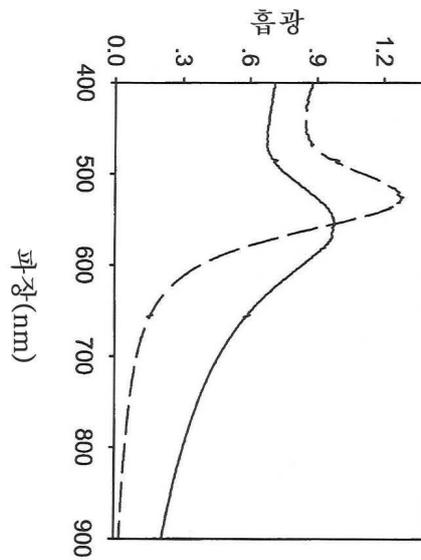
도면3c



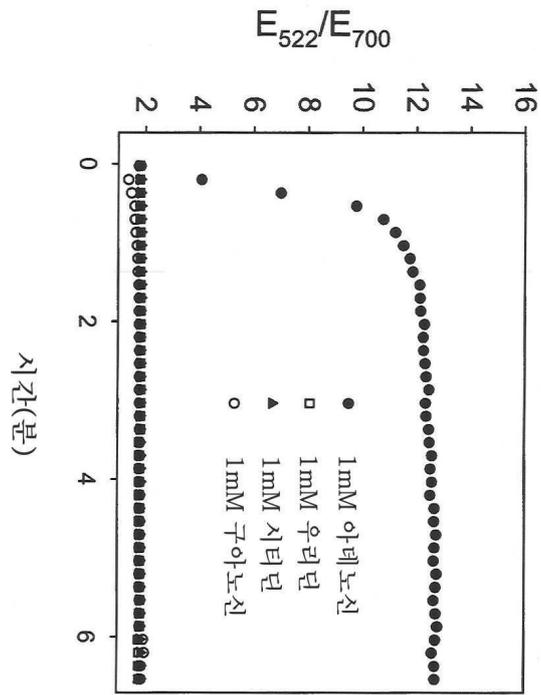
도면3d



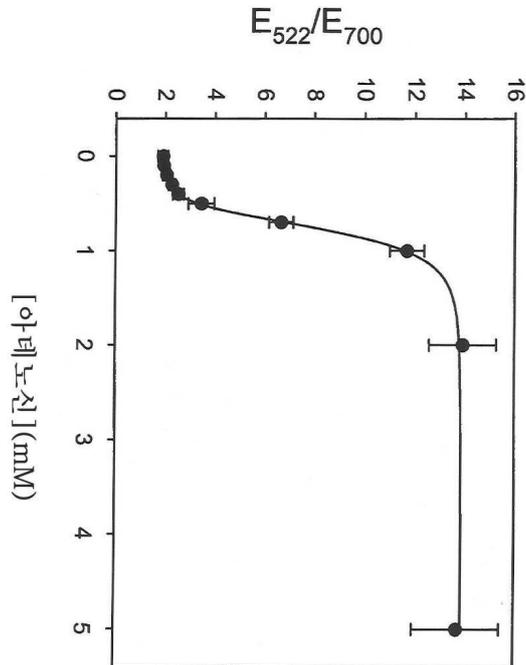
도면4



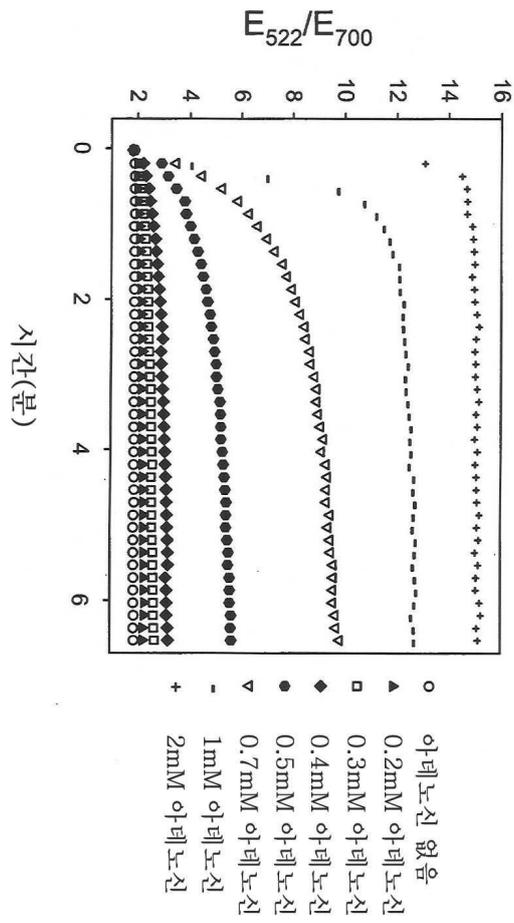
도면5a



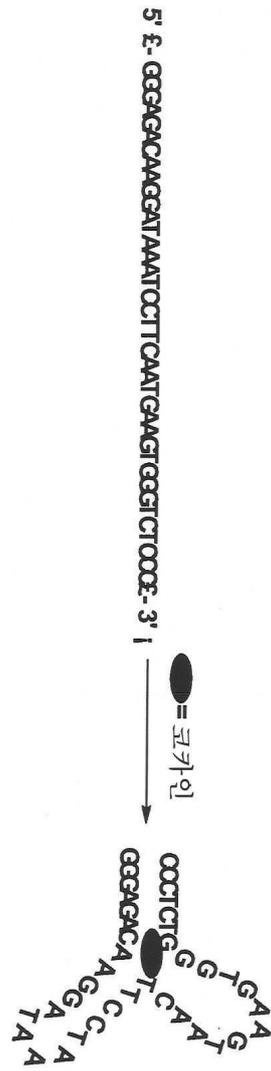
도면5b



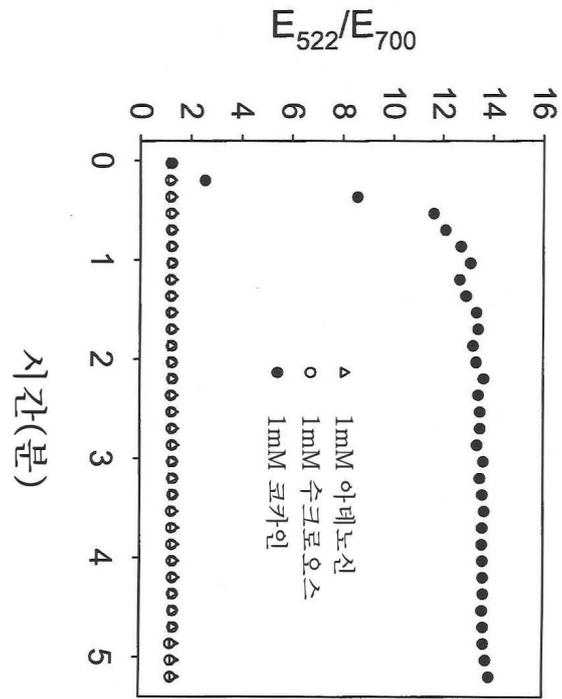
도면5c



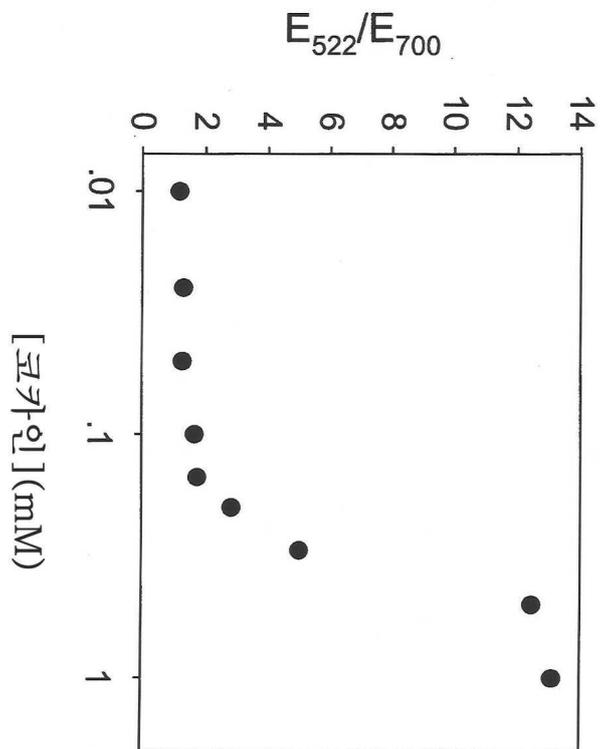
도면7b



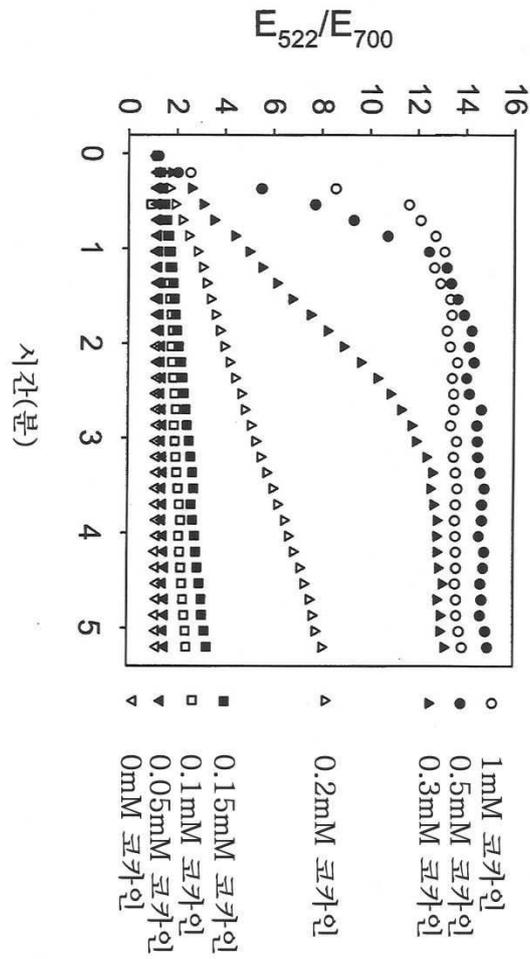
도면8a



도면8b



도면8c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> LU, YI
LIU, JUEWEN

<120> APTAMER-BASED COLORIMETRIC SENSOR SYSTEMS

<130> ILL01-076-US

<140> 11/202,380

<141> 2005-08-11

<160> 59

<170> Patent In Ver. 3.3

<210> 1

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 1
 gggttagggt tagggttagg g

21

<210> 2
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 2
 aggcgaggug aaaugagcgg uauuagccu

29

<210> 3
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 3
 gggagaggau acuacacgug auagucaggg aacaugacaa acacagggac uugcgaaaau
 caguguuuug ccauugcaug uagcagaagc uuccg

60

95

<210> 4
 <211> 132
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

aptamer motif sequence

<400> 4

gggagaattc ccgcggcaga agcccacctg gctttgaact ctatgttatt ggtggggga 60
 aacttaagaa aactaccacc cttaacatt accgccttc agcctgccag cgcctgcag 120
 cccgggaagc tt 132

<210> 5

<211> 38

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 5

ggaucccgac uggcgagagc cagguaacga auggaucc 38

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 6

ccggccaagg gtgggagga gggggccgg 29

<210> 7

<211> 61

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 7

auggcaccga ccuagggcuc ggggugccag agguuccaca cuuucacga aaagccuag 60
 c 61

<210> 8
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 8
ggcgauacca gccgaaaggc ccuuggcagc guc 33

<210> 9
<211> 52
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 9
gauaggacga uauucgaaaa ucaccagauu ggaccucuggu uaacgaucga uu 52

<210> 10
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 10
gggagacaag gataaatcct tcaatgaagt gggtcgaca 39

<210> 11
<211> 67
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 11

gggaauuccg cgugugcgcc gcggaagagg gaauauagag gccagcacau agugaggccc 60
uccucc

67

<210> 12

<211> 72

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 12

gggagcucag aauaaacgcu caaggaggac cgugcacucc ucgaacauuu cgagaugaga 60
cacggauccu gc

72

<210> 13

<211> 44

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 13

gacgagaagg agugcugguu auacuagcgg uuaggucacu cguc 44

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 14
acctggggga gtattgcgga ggaaggt

27

<210> 15
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 15
ggaagagaug gcgacuaaaa cgacuugucg c

31

<210> 16
<211> 39
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 16
ucuagcaguu cagguaacca cguaagauac gggucuaga

39

<210> 17
<211> 84
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (44)
<223> a, c, g, or u

<220>
 <221> modified_base
 <222> (56)
 <223> a, c, g, or u

<400> 17
 gggagcucag aaauaacgcu caaccgaca gaucggcaac gccnuguuuu cgacangaga 60
 caccgauccu gcaccaaagc uucc 84

<210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 18
 acctggggga gtattgcgga ggaaggt 27

<210> 19
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 19
 gcagtctcgt cgacaccag cagcgcattgt aactccata catgtgtgtg ctggatccga 60
 cgcag 65

<210> 20
 <211> 52
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 20
gggcacgagc gaagggcaua agcugacgaa agucagacaa gacauggugc cc 52

<210> 21
<211> 49
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 21
ggaaccaac uaggcguuug aggggauucg gccacgguaa caaccccuc 49

<210> 22
<211> 45
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 22
gggcuaaagg uauuuuuuuc cauacaaguu uacaagaaag augca 45

<210> 23
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
aptamer motif sequence

<400> 23
taactaaat gtggagggtg ggacgggaag aagttta 37

<210> 24
<211> 31
<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 24

ccggugcgca uaaccaccuc agugcgagca a

31

<210> 25

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 25

gggagaauc cgaccagaag cuuggguugu cuuguacguu cacuguuacg auuguguuag
guuuuacuac acuuugcaau cgcauugug cgucuacaug gauccuca

60

108

<210> 26

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 26

gcgggttgg gcgggtgggt tcgctgggca gggggcgagt g

41

<210> 27

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 27
 uacagaaugg guugguaggc auaccuaauc gagaaugaua 40

<210> 28
 <211> 113
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 28
 ggagcucagc cuucacugca augggccgcu agguugaugu gcagugaagu cagcugaggc 60
 ccagggcuga aaggauccg ccuccugacu cguggcacca cggucggauc cac 113

<210> 29
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 29
 ggaucgcauu uggacuucug cccagggggc accacggucg gauc 45

<210> 30
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 aptamer motif sequence

<400> 30
 ggccuaaaac auaccagauu ucgaucugga gaggugaaga auucgaccac cuaggccggu 60

<210> 31
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 31
 acgtgaatga tagacgtatg tcgagttgct gtgtgcggat gaacgt 46

<210> 32
 <211> 107
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer motif sequence

<400> 32
 gggagcugag aauaaacgcu caagggcaac gcgggcaccc cgacaggugc aaaaacgcac 60
 cgacgcccgg ccgaagaagg ggauucgaca ugaggcccgg auccggc 107

<210> 33
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Human immunodeficiency virus

<400> 33
 uccguuuuca gucgggaaaa acug 24

<210> 34
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 ggttggtgtg gttgg 15

<210> 35

<211> 23
 <212> RNA
 <213> Unknown Organism

<220>
 <223> Description of Unknown Organism: VEGF motif
 sequence

<400> 35
 gcgguaggaa gaauuggaag cgc 23

<210> 36
 <211> 98
 <212> RNA
 <213> Unknown Organism

<220>
 <223> Description of Unknown Organism: NF-kB

<400> 36
 gggauauccu cgagacauaa gaaacaagau agauccugaa acuguuuuaa gguuggccga 60
 ucuucugcuc gagaaugcau gaagcguucc auauuuuu 98

<210> 37
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 ggggcacgtt tatccgtccc tctagtggc gtgcccc 37

<210> 38
 <211> 44
 <212> RNA
 <213> Unknown Organism

<220>
 <223> Description of Unknown Organism: Elongation factor
 Tu

<400> 38
 ggggcuaauug ugacucagcg guucgacccc gcuuagcucc acca 44

<210> 39
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 ugacguccuu agaauugcgc auuccucaca caggaucuu 39

<210> 40
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Unknown Organism

<220>
 <223> Description of Unknown Organism: YPEN-1
 endothelial sequence

<400> 40
 ataccagctt attcaattag gcggtgcatt gtggttgta gtatacatga ggtttggttg 60
 agactagtcg caagatatag atagtaagtg caatct 96

<210> 41

<400> 41
 000

<210> 42
 <211> 28
 <212> RNA
 <213> Rous sarcoma virus

<400> 42
 aggacccucg agggagguug cgcagggu 28

<210> 43
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 43

tcacagatga gt

12

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 44

tcacagatga gtaaaaaaaaa aaaa

24

<210> 45

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 45

cccaggttct ct

12

<210> 46

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 46

actcatctgt gaagagaacc tgggggagta ttgcggagga aggt

44

<210> 47
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 47
actcatctgt gaagaga 17

<210> 48
<211> 7
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 48
acctggg 7

<210> 49
<211> 7
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 49
tggaccc 7

<210> 50
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker

<400> 50

actcatctgt gaagatgacc tgggggagta ttgcggagga aggt

44

<210> 51

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic linker

<400> 51

actcatctgt gaagagaacc tgggggagta ttgcggagga aggt

44

<210> 52

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic potassium linker

<400> 52

actcatctgt gatctaaggg ttagggtag ggttaggg

38

<210> 53

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 53

aacccttaga

10

<210> 54

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic cocaine linker

<400> 54

actcatctgt gaatctcggg agacaaggat aaatccttca atgaagtggg tctccc

56

<210> 55

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 55

gtctcccgag a

11

<210> 56

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer

<400> 56

gggagacaag gataaatcct tcaatgaagt gggctctccc

39

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer

<400> 57

acctggggga gtattgcgga ggaaggt

27

<210> 58

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 58

gtctcccgag at

12

<210> 59

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic aptamer

<400> 59

gggagacaag gataaatcct tcaatgaagt ggtctccc

39