(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0083970
(43) 공개일자 2010년07월23일

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0003327
(22) 출원일자 2009년01월15일
심사청구일자 2009년01월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
구만복
서울시 동대문구 이문2동 426 삼성래미안 아파트 202동 602호
정춘복
경기도 안산시 상록구 성포동 신우연립 9-403호
쟈벳
고려대학교 생명과학대학 543호
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 9 항

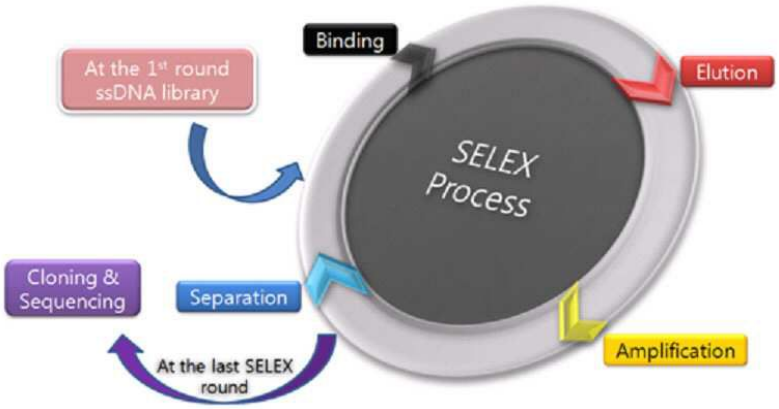
(54) 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머에 관한 것으로, 상세하게는 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선택된 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 랜덤 DNA pool로부터 디클로페낙에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 DNA 앱타머를 SELEX process의 변형된 방법인 FluMag-SELEX를 이용하여 선별하고, 선별된 DNA 앱타머들의 염기서열, 특성 및 디클로페낙에 대한 결합력을 분석하였다. 따라서 본 발명의 DNA 앱타머를 이용하여 수생태계에 잔류하는 의약물, 특히 디클로페낙의 검출 및 제거를 보다 효과적으로 수행할 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	GR070045
부처명	서울시
연구사업명	
연구과제명	안전한 식수확보를 위한 신속 정확한 휴대형 유해물질 검출시스템 개발
주관기관	고려대학교 생명공학연구소
연구기간	2008년 8월 1일 ~ 2009년 7월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

디클로페낙(diclofenac)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 1 내지 서열번호 45 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 디클로페낙에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머.

청구항 3

하기 단계들을 포함하는 디클로페낙(diclofenac)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 제조방법:

a) 디클로페낙과 자성비드(magnetic beads)를 붕산염 버퍼용액에서 반응시켜 공유결합을 유도하는 단계;

b) 양 끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30-50개의 임의의 염기를 가지는 DNA pool과 상기 공유결합으로 얻은 디클로페낙-자성비드를 버퍼용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;

c) 상기 디클로페낙-자성비드에 결합된 DNA를 자석을 이용하여 분리하는 단계;

d) 상기 분리된 디클로페낙-자성비드로부터 DNA를 분리시키는 단계; 및

e) 상기 PCR용 프라이머 영역에 상보적인 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하여 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 DNA를 증폭시키는 단계.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 a)단계의 공유결합은 디클로페낙의 카복실기(carboxyl group)와 자성비드의 아민기(amine group)의 공유결합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 a)단계 후, 공유결합된 디클로페낙-자성비드에서 디클로페낙과 결합하지 않은 자성비드의 아민기를 에탄올아민(ethanol amine) 용액으로 20-30℃에서 10-50분간 반응시켜 불활성화 시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 d)단계에서 DNA의 분리는 70-90℃에 3-10분간 두어 DNA를 디클로페낙-자성비드로부터 분리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 3항에 있어서, e)단계에서 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 상기 플루오레세인에 의해 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

디클로페낙에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 디클로페낙 검출용 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 제 1항의 앱타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 디클로페낙(diclofenac)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선택된 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 본 발명은 대표적인 비스테로이드성 항염제(NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drugs) 인 디클로페낙(Diclofenac)에만 특이적으로 결합하는 핵산 구조체인 앱타머를 자성 비드와 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 이용하여 개발하는 방법과, 개발된 앱타머에 관한 것이다. 이 핵산 앱타머를 이용하여 식품이나 하천에 잔류되어 있는 매우 적은 양의 디클로페낙(Diclofenac)까지 검출할 수 있다.

[0003] 디클로페낙(Diclofenac)은 진통, 항염증 및 해열작용을 하는 현재 가장 널리 이용되는 소염진통제이다. 주요 기작으로는, 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase)의 활성을 막아 프로스타글란딘(prostaglandin)의 합성을 저해해 염증반응을 억제하는 것이다. 또한 디클로페낙은 퇴행성 관절증이나 관절염 증상에 사용되고 있다. 그러나 문제되는 점은 디클로페낙이 효과적인 소염진통제이지만 장기간 사용하였을 때 심장발작, 위장계 염증, 두통, 어지러움, 피부 발진을 유발할 위험이 있고 간과 신장에 피해를 줄 수 있다는 것이다. 인간뿐만 아니라 환경에도 영향을 주어, 무지개송어와 같은 민물고기들에게 문제를 일으킨 여러 논문들이 발표되어 있다. 게다가 디클로페낙은 일반적인 환경에서 매우 안정하기 때문에 물의 순환계에서 가장 빈번하게 발견되는 의약품이기도 하며 이미 미국, 독일을 포함한 여러 나라들에서 상하수와 지표수 및 지하수에 이르기까지 평균적으로 ppb 농도로 검출되고 있는 실정이다. 우리나라에서도 낙동강과 한강을 포함한 5대강에서 높은 농도의 디클로페낙이 발견되기도 했다. 오랫동안 낮은 농도의 디클로페낙에 노출되었을 때의 부작용에 대한 연구는 아직 미진하지만 장기간 사용하였을 때 나타나는 여러 부작용들과 수생태계에 대한 영향을 고려해보면, 의약품의 오남용을 방지하는 것은 물론이고 식수의 안전성을 확보하기 위해 잔류되어 있는 의약품을 검출해내는 방법을 개발하는 것이 필요한 실정이다.

[0004] 또한, 기존의 잔류의약품 검출방법은 잔류 의약품이 녹아있는 성분에 따라 각기 다른 시험용액을 조제하여 잔류의약품을 추출, 정제하여 액체크로마토그래피로 정량하는 방법을 사용한다. 어떤 물질에서든 특이적으로 디클로페낙(Diclofenac)에 결합하여 검출이 가능한 앱타머와는 달리 기존의 방법은 녹인 물질에 따른 시험법도 소수이며, 시험용액을 각기 조제하는 데에도 번거롭다. 또한 추출, 정제 과정 중에 디클로페낙(Diclofenac)의 손실이 있을 수도 있으므로 정확한 정량이 어렵다.

[0005] 한편, 앱타머는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA의 구조체를 말한다. 앱타머는 센서 분야에서 이용되는 기존의 감지물질인 항체보다도 훨씬 타겟에 대한 친화도가 높고 열 안정성이 우수하며 시험관내(*in vitro*)에서 합성이 가능하기 때문에, 동물에게 항원을 주입하여 항체를 얻어낼 필요가 없어 비용 면에서 훨씬 우위에 있으며 타겟 물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자나 환경호르몬이나 항생제 같은 작은 유기화학 물질, 박테리아 등의 다양한 타겟에 대한 앱타머를 합성할 수 있다. 이렇게 표적 물

질과 특이적으로 결합하는 앱타머의 특성으로 인해 최근 들어 앱타머를 신약개발, 약물전달 시스템 그리고 바이오센서 등의 연구에 이용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 위험이 있는 디클로페낙을 검출할 수 있는 방법을 연구노력한 결과, 디클로페낙에 특이적으로 높은 친화력으로 결합하는 본 발명의 앱타머는 극미량의 잔류 디클로페낙의 검출에 적용할 수 있는 매우 적절한 물질임을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 소염진통제로 광범위하게 사용되고 있는 디클로페낙을 검출 및 제거할 수 있는, 디클로페낙에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 DNA 앱타머 및 그 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 DNA 앱타머를 이용한 디클로페낙 검출용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 디클로페낙(diclofenac)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 제공한다. 본 발명에서는 상기 디클로페낙에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 SELEX process를 이용하여 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선택하였다.

[0010] 본 발명에 사용된 용어 'SELEX(Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) process'는 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법 (Louis C. Bock, et al., 1992. Nature 355, 564-566)을 말한다.

[0011] 또한 본 발명에 사용된 'FluMag-SELEX process'는 DNA 증폭단계에서 형광 표지된 프라이머를 사용함으로서 이어지는 폴리아크릴아마이드 겔을 이용한 PCR product 분리과정(이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로)에서 형광을 띠는 밴드만 취하면 되는 이점을 이용하기 위한 변형된 방법이며, 타겟과 결합하는/결합하지 않는 DNA를 구별해내는 방법으로 자석(magnet)을 이용한 SELEX 방법이다. 기존의 다른 SELEX의 경우, 방사선 표지(radioactive label), capillary electrophoresis, membrane filter 등을 이용했었는데, 경비가 많이 들고 핸들링 하기가 어려운 단점이 있다. PCR product를 분리하기 위해서는 chromatography, affinity column 등이 이용되었지만 가격이 비싸고, 효율이 떨어지는 문제가 있다(R. Stoltenburg, et al., (2005) Anal Bioanal Chem 383: 83-91).

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 상기 SELEX process에 의해 선택된 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 어떠한 염기서열의 DNA 앱타머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 45 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 디클로페낙(diclofenac)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 제조방법을 제공한다:

[0014] a) 디클로페낙과 자성비드(magnetic beads)를 붕산염 버퍼용액에서 반응시켜 공유결합을 유도하는 단계;

[0015] b) 양 끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30-50개의 임의의 염기를 가지는 DNA pool과 상기 공유결합으로 얻은 디클로페낙-자성비드를 버퍼용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;

[0016] c) 상기 디클로페낙-자성비드에 결합된 DNA를 자석을 이용하여 분리하는 단계;

[0017] d) 상기 분리된 디클로페낙-자성비드로부터 DNA를 분리시키는 단계; 및

[0018] e) 상기 PCR용 프라이머 영역에 상보적인 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하여 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 DNA를 증폭시키는 단계.

[0019] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계의 공유결합은 디클로페낙의 카복실기(carboxyl group)와 자성비드의 아민기

(amine group)의 공유결합인 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계 후, 공유결합된 디클로페낙-자성비드에서 디클로페낙과 결합하지 않은 자성비드의 아민기를 에탄올아민(ethanol amine) 용액으로 20-30℃에서 10-50분간 반응시켜 불활성화 시키는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 상기 불활성화 단계를 수행함으로써, 이후 수행되는 DNA 앱타머 제조과정에서 다클로페낙-자성비드 결합체에 다른 DNA 또는 타물질이 비특이적으로 결합하거나, 또는 결합력이 약한 DNA의 결합 또는 타물질의 오염을 방지할 수 있다.

[0021] 본 발명의 방법에서, 상기 d)단계에서 DNA의 분리는 70-90℃에 3-10분간 두어 DNA를 디클로페낙-자성비드로부터 분리하는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 방법에서, 상기 e)단계에서 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 상기 플루오레세인에 의해 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 디클로페낙에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 디클로페낙 검출용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 상기 DNA 앱타머는 상기 언급된, 서열번호 1 내지 서열번호 45 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다.

[0025] 본 발명의 디클로페낙은 상술한 바와 같이, 효과적인 소염진통제이지만 장기간 노출되었을 때 신체 여러 기관에서 다양한 부작용을 유발할 수 있다. 또한 환경 및 자연 생태계, 특히 무지개송어와 같은 민물고기들에게 문제를 일으킬 수 있으므로 수생태계에 존재하는 잔류 디클로페낙을 검출 및 제거하는 기술은 반드시 필요하다. 따라서 수생태계에 존재하는 잔류 디클로페낙을 효과적으로 검출 및 제거하기 위해, 본 발명의 DNA 앱타머를 포함하는 디클로페낙 검출용 조성물은, 다양한 태로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 DNA 앱타머를 자성비드에 고정화시켜 디클로페낙을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앱타머-디클로페낙 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 디클로페낙을 분리함으로써 디클로페낙만을 선택적으로 검출 및 제거할 수 있다. 또 다른 방법으로, 본 발명의 DNA 앱타머와 연결자로 연결된 센서를 이용하여 시료 중의 디클로페낙을 검출하는 방법 등을 사용할 수 있다.

[0026] 하나의 구현예에서, 본 발명의 디클로페낙 검출용 조성물은 상기 DNA 앱타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 디클로페낙을 포함하는 시료를 통과시켜 디클로페낙만을 선택적으로 제거할 수 있다.

[0027] 이하, 본 발명의 디클로페낙에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 제조방법 및 특성 분석방법을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.

[0028] 1) 자성비드에 디클로페낙(Diclofenac: DCF)의 고정

[0029] DCF의 카복실기와 자성비드의 아미노기는 공유결합을 형성하게 되는데 이것을 위해 DCF를 자성비드와 함께 버퍼용액에 넣고 반응시킨다. DCF가 결합된 각각의 자성비드는 자석을 이용해서 분리가 가능하며 같은 버퍼용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않은 DCF를 제거한다.

[0030] 2) 디클로페낙(Diclofenac) 결합 특이적 DNA 앱타머 개발

[0031] 표적물질 특이적인 앱타머를 개발하기 위한 방법으로는 일반적으로 SELEX(Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) 방법이 널리 사용되고 있다. 보통의 경우 한가지의 타겟에만 친화도를 가지는 앱타머를 개발하는 것이 주 목표이기 때문에 SELEX 과정 동안에 한 가지의 타겟만이 이용된다.

[0032] 본 발명에서는 디클로페낙에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 개발하기 위하여 Flu-Mag SELEX를 사용하여 DCF에 결합하는 앱타머를 개발하였다. 이를 위하여 먼저 40개의 임의의 염기와 양 끝에 각각 18개의 프라이머를 가진 DNA pool을 합성하였으며, 이 DNA pool을 먼저 DCF가 고정되어 있는 자성비드와 함께 버퍼용액에 넣고 혼합하여 결합반응을 시킨 후 자석을 이용해 DCF와 결합하지 않은 DNA를 제거한다. 고온 처리를 하여 DCF와 결합한

DNA를 자성비드에서부터 분리시킨 다음 에탄올 침전법으로 용리된 DNA를 확보한다.

[0033] 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 PCR을 수행하고 PCR 반응물을 정제한 후 고농도의 요소가 들어있는 폴리아크릴아마이드 겔로 전기영동을 하여 분리된 두 개의 단일가닥 DNA를 얻는다. 적합한 DNA 밴드를 겔 추출한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보한다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 DCF가 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 DCF와 반응시킨다. 이러한 일련의 과정을 반복하여 DCF에 강하게 결합할 수 있는 DNA를 획득할 수 있다. 상기 과정을 통해 선별된 DNA를 TOPO 클로닝 키트를 이용하여 클로닝하고 얻어진 콜로니로부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과 디클로페낙에 결합 특이적인 서로 다른 45개의 핵산 구조체를 확보하였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0035] **실시예 1. 자성비드에 디클로페낙의 고정**

[0036] 디클로페낙의 카복실기와 자성비드의 아민기의 공유결합을 유도하기 위하여, 5 mM의 디클로페낙(diclofenac: DCF, Sigma Co.)과 1×10^{9} 개의 자성비드(M270 Amine Magnetic Beads, Dynal Biotech ASA, Norway)를 버퍼용액(0.1 M borate buffer, pH 9.5)에 넣고 25℃에서 2시간 반응시켰다. DCF가 결합된 자성비드는 자석을 이용해서 분리가 가능하며 같은 버퍼용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않은 DCF를 제거하였다. DCF가 결합된 자성비드(이하 'DCF-자성비드')는 세척 후 1 M의 에탄올아민 용액(pH 8.0)과 25℃에서 30분간 반응시켜 결합하지 않은 자성비드의 아민기들을 불활성화 시켰다. 이어서 수차례 세척 후 버퍼용액(0.1 M PBS buffer, pH 7.4)에 DCF-자성비드를 혼합하여 4℃에서 보관하였다.

[0037] **실시예 2. 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성**

[0038] 76mer DNA pool로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역(primer region)이 있고 중앙에 40개의 임의의 염기를 가진 DNA pool을 아래와 같이 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA pool은 Genotech Inc.(Korea)에서 화학적으로 합성을 의뢰하였다.

[0039] CGTACGGAATTCGCTAGC-N40-GGATCCGAGCTCCACGTG

[0040] **실시예 3. 디클로페낙과 결합한 DNA 앱타머의 선별**

[0041] 실시예 2에서 합성된 랜덤 DNA pool을 먼저 0.263 μmole의 DCF가 고정되어 있는 자성비드(DCF-자성비드)와 함께 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM MgCl2, 5 mM KCL, 1 mM $CaCl_2$ and 0.02% Tween 20)에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, DCF와 결합하지 않은 DNA를 제거하기 위해 상기 혼합액이 들어있는 튜브를 자석에 고정시켜서 DCF와 결합하지 않은 DNA를 제거하고, 결합력이 약한 DNA를 제거하기 위해 버퍼용액으로 5회 세척하였다. DCF와 결합한 DNA를 용리하기 위해서는 튜브를 65℃에서 5분간 두어 DNA를 자성비드에서부터 분리시킨 다음 에탄올 침전법으로 용리된 DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 DCF에 결합하는 DNA의 양을 측정하였다. 도 3에서, eluted ssDNA가 각각의 선별단계(selection round)에서 얻어진 디클로페낙에 결합하는 DNA의 양을 보여준다.

[0042] **실시예 4. 디클로페낙과 결합 가능한 DNA 앱타머 pool의 제조**

[0043] 디클로페낙 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생산물은 이중가닥 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하는 과정을 위해, 먼저 하기와 같이 하

나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein, FP)을 고정하였다.

[0044] forward (APTFf) 5'-fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC-3'

[0045] reverse (APTR) 5'-CACGTGGAGCTCGGATCC-3'

[0046] PCR 반응물을 정제키트(Purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시하였다. 10 %의 폴리아크릴아마이드 젤에는 6M의 요소(urea), 20 %의 포름아마이드가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 fluorescein이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다.

[0047] 플루오레세인이 붙어 있는 DNA 밴드를 잘라내어 겔 추출(gel extraction)을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 DCF가 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 DCF와 반응시켰다. 이러한 일련의 과정을 도 2에 제시하였으며, 이 과정을 한 번의 선별(selection)이라 하면 총 9번의 선별 과정을 거쳐 90% 이상이 DCF에 결합하는 DNA pool을 얻었다 (도 3 참조). 그리고 두 번째, 세 번째 선별 과정 중간에 총 세 번의 카운터 선별(counter selection) 과정을 통해 DNA의 DCF에 대한 특이도(specificity)를 강화시켰다. 이 때 사용된 카운터 타겟(counter target)은 자성 비드, 4-amino-3,5-dichlorobenzoic (Sigma Co.), 및 2-Anilinophenylacetic acid (Sigma Co.)로서 DCF와 화학적 구조가 유사한 물질들을 사용함으로써 비특이적으로 결합하는 DNA를 차단하고 DCF에만 특이적으로 결합하는 DNA pool을 선별할 수 있었다. 도 2에 DCF 앱타머를 개발하는 과정을 모식도로 나타내었으며, 각각의 선별에서 자성비드에서부터 용리된 ssDNA의 퍼센트를 도 3에 제시하였다.

[0048] 최종적으로 얻어진 DNA pool을 TOPO 클로닝 키트(cloning kit)를 이용하여 클로닝하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과, 서로 다른 45종의 DCF에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체(DNA 앱타머)를 확보하였다.

[0049] **실시예 5. 디클로페낙과 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 특성 분석**

[0050] 서로 다른 45종의 DCF에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1에 제시하였다. 또한 이 45종의 DCF 앱타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 4 내지 도 48에 나타내었다: 도 4부터 도 48까지, 각각 앱타머 No. D2, D3, D4a, D6, D8, D10, D12, D14, D16, D18, D22, D24, D25, D30, D31a, D32a, D32d, D33, D35, D40, DA1, DA2, DA3, DA4, DA5, DA6, DA7, DA8, DA9, DA10, DA11, DA12, DA14, DA16, DA17, DA18, DA19, DA20, DA21, DA22, DA23, DA25, DA26, DA27 및 DA28.

[0051] [표 1-1]. 디클로페낙에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 45종의 DNA 앱타머 염기서열

서열 번호	앱타머 (apt No.)	Sequence Information
1	D2	ATACCAGCTTATTCAATTGGAGGGAGGTGTAGGCGACTGG TTAGGCGCAAGAGGCTATAGATAGTAAGTGCAATCT
2	D3	ATACCAGCTTATTCAATTGCAACGTGGCGGTCAGTCAGCG GGTGGTGGGTTCGGTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
3	D4a	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCGGACAGCACGCAGATCAA ACGTCCCATACCGGTCCTAGATAGTAAGTGCAATCT
4	D6	ATACCAGCTTATTCAATTGACGGGCGAGGTCGACTGCATC CCAATCTGTGTGAGTCCTAGATAGTAAGTGCAATCT
5	D8	ATACCAGCTTATTCAATTGGCCGCGACTCACTGGGTCGGT GGATGTACTACGCGTCTGAGATAGTAAGTGCAATCT
6	D10	ATACCAGCTTATTCAATTACACACCGAGACCGCACTTGTAC TCCCTAGCCGCCTCCGTAGATAGTAAGTGCAATCT
7	D12	ATACCAGCTTATTCAATTGGACACCGAGACCGCACTTGTAC TCCCGTCGCATGTTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
8	D14	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCGGGAGAGTCGGTCAACAC TGTGTGCTAGGTGTCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
9	D16	ATACCAGCTTATTCAATTGCCCGGCAACAGGTTGTGACATG CCAGTGCGAGACCGCCCGAGATAGTAAGTGCAATCT
10	D18	ATACCAGCTTATTCAATTACACACCGAGACCGCACTTGTAC TCCCTAGCCGCCCTCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
11	D22	ATACCAGCTTATTCAATTGGCAGTAGGTGTACATGCAAAGC CAGTGTGGGTCCCTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
12	D24	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCACACTAACGAGACACACCT GACCACGCCTGCCCGTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
13	D25	ATACCAGCTTATTCAATTGACACCATTTGCGGCCCATCCCC GACTGTGTAGCTGCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
14	D30	ATACCAGCTTATTCAATTGGCACGATGATCTGCATTGTACG CTATAACCCATATGCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
15	D31a	ATACCAGCTTATTCAATTGCAGCGAGGTCCGACACCACTC CTCCGTCCACCCTTGTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
16	D32a	ATACCAGCTTATTCAATTACCCGCAGACACCTCGATCGTAT CACATTGACCCCCCCGTAGATAGTAAGTGCAATCT
17	D32d	ATACCAGCTTATTCAATTGGCGACGGACCTGTGATGTGTG TATGGCTCTAGGGGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
18	D33	ATACCAGCTTATTCAATTGGCGGGGGGGATGTGTGTACGTG CCACGATCGACATTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
19	D35	ATACCAGCTTATTCAATTACACAGTTACAGCCGGGCTTGGC CGATAGGTAGCCTCTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
20	D40	ATACCAGCTTATTCAATTGGCCACACACAGACTATGGTGCT ACTCCCCCCATCCCCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
21	DA1	ATACCAGCTTATTCAATTGGCAACGATCCGTCTGGCTGTCG GCTATTGTGTCCTTCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
22	DA2	ATACCAGCTTATTCAATTGTGTCGGCAATGCGGGTTGTTGT CGGTTCGTCGTCGCTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
23	DA3	ATACCAGCTTATTCAATTACGGACCCTCGTGTGCGGCCAG CACCATTATCCCTGCGCTAGATAGTAAGTGCAATCT

[0052]

[0053] [표 1-2].

서열 번호	앱타머 (apt No.)	Sequence Information
24	DA4	ATACCAGCTTATTCAATTCGACGTGTGGTGTGTCCCCTGC TGGATCTGCTGCCGTGCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
25	DA5	ATACCAGCTTATTCAATTGGCAACATACCCGGCACCCTGA CTCCATTCGGGCTTGTGCAGATAGTAAGTGCAATCT
26	DA6	ATACCAGCTTATTCAATTGGCAGTTGTCCTTAGCCGATGTA TTGCTCCTGCCCTGTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
27	DA7	ATACCAGCTTATTCAATTGCACAGGTACAATGTATGCCCAT GACACGATGACCCCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
28	DA8	ATACCAGCTTATTCAATTCGTTCGTGATACGGACTGTTTCA GCCCACGACCTTCCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
29	DA9	ATACCAGCTTATTCAATTGGGTACTACAGACTGCCGCCGTA GTCGATATCTTCGCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
30	DA10	ATACCAGCTTATTCAATTGAGACGTTCAGTCGGACCACTCT CATCCCGCGTGTACCGTCAGATAGTAAGTGCAATCT
31	DA11	ATACCAGCTTATTCAATTGGCGGCCAGGACTAGATGTTCGC GTCTACTGCTGATGTCGAGATAGTAAGTGCAATCT
32	DA12	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCAGTCATTATGATCCCCTCA CTGTGCCCTGTGCTGCCAGATAGTAAGTGCAATCT
33	DA14	ATACCAGCTTATTCAATTGGGTACGAAGACATCCCCATCAG CCCTCAACTCCGGTGCTAGATAGTAAGTGCAATCT
34	DA16	ATACCAGCTTATTCAATTGGGGTAACATGGCGTGACCTACT GCGCGAGGAGCCTGTCTAGATAGTAAGTGCAATCT
35	DA17	ATACCAGCTTATTCAATTGTACGTCGGCTTATTGCATACATC CCCACTGTAGCCCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
36	DA18	ATACCAGCTTATTCAATTGGGGACGATGGAGAGCGCAGGC TGGCTACTGGTGTGGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
37	DA19	ATACCAGCTTATTCAATTACACGCGATGACATTGTTGCCGC CCGACCCTGCCGTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
38	DA20	ATACCAGCTTATTCAATTGAGGAGCATGTATCCGAGTGGGA TCAGGTATTGACGGCCTAGATAGTAAGTGCAATCT
39	DA21	ATACCAGCTTATTCAATTGTGTCGTGTCACCTACCGATACAT ATGAACTCGCTACCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
40	DA22	ATACCAGCTTATTCAATTACACACCGAGACCGCACTTGTAC TCCCTAGCCGCCTCCGTAGATAGTAAGTGCAATCT
41	DA23	ATACCAGCTTATTCAATTAGTAGGTTTGCCCGTTCATGTCC CATTACAGCAGCTGCCGAGATAGTAAGTGCAATCT
42	DA25	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCGAACTTACGAGACACACCT GACCACGCCTGCCCGTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
43	DA26	ATACCAGCTTATTCAATTACACACCGAGACCGCACTTATAC TCCCTAGCCGCCTCCGTAGATAGTAAGTGCAATCT
44	DA27	ATACCAGCTTATTCAATTGGGAAGGACGACAGTAGGTTCC AGGGTCAGGCGCATTGTTAGATAGTAAGTGCAATCT
45	DA28	ATACCAGCTTATTCAATTAGGATGCCGATGAGTGCTAGTG TGCTATGACTACGCGCCCAGATAGTAAGTGCAATCT

[0054]

[0055] 이들 중에서 DCF에 대한 친화도가 가장 높은 4종의 앱타머를 다음의 방법으로 선택하였다.

[0056] 우선, 1.31 nmol의 DCF가 고정된 자성비드와 0부터 1 μM의 서로 다른 농도의 앱타머를 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM KCL, 1 mM $CaCl_2$ and 0.02% Tween 20)에 넣고 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 이후 세 번의 바인딩 버퍼를 통한 세척(washing)을 해주어 DCF에 결합하지 않는 DNA들을 제거하고 이후 75℃에서 7분 동안 해리버퍼와 함께 반응시켜 얻은 DCF와 결합하는 DNA의 양을 측정하여 그 양을 계산하였다. 이러한 과정을 통해 45종의 앱타머 중에서 결합력이 가장 강한 4종의 앱타머 D3, D10, D16, D22를 선정하였다.

[0057] 각각의 DCF에 대한 결합된 앱타머의 농도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 Sigmaplot 8.0을 이용하여 plotting 되었고, 여기에 y=Bmax* X/Kd + X 식이 이용되었다 (y는 포화도, Bmax는 최대 결합위치, Kd는 해리상수, X 는 결합하지 않은 앱타머). 결과는 하기 표 2에 나타내었다. D3의 Kd값이 42.7 nM, D10

의 Kd값이 100.64 nM로서 DCF와 매우 강력하게 결합하는 것이 확인되었고, 각 앱타머(No. D3, D10, D16 및 D22)의 DCF에 대한 결합곡선을 도 49 내지 도 52에 제시하였다.

[0058] [표 2]. 디클로페낙에 대한 결합력이 가장 강한 4종의 앱타머

[0059]

aptamer no.	해리상수(K_d) 값
D3	42.7 nM
D10	100.64 nM
D16	148.73 nM
D22	166.34 nM

[0060] 또한, DCF 앱타머가 DCF에만 특이적으로 결합하는 것을 보여주기 위한 대조군으로 자성비드, 4-amino-3,5-dichlorobenzoic, 및 2-Anilinophenylacetic acid가 사용되었다.

[0061] 먼저, 각각의 4-amino-3,5-dichlorobenzoic, 2-Anilinophenylacetic acid와 DCF를 자성비드에 고정하였다. 동시에 상기 케미컬들이 고정된 자성비드와 3종의 DCF 앱타머(D3, D16, D22) 500 nM을 각각 혼합하여 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$ and 0.02% Tween 20)에 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 자석을 이용하여 자성비드를 분리시키고 결합하지 않은 앱타머가 포함된 버퍼용액을 따로 취한 후. nanodropdm로 DNA를 측정하여 각각의 케미컬과 앱타머의 결합을 계산하였다.

[0062] 분석결과 도 53에서, DCF에 대한 결합력은 뚜렷한 반면에 자성비드 및 화학적으로 유사한 4-amino-3,5-dichlorobenzoic (counter-1), 2-Anilinophenylacetic acid (counter-2)에 대한 결합은 전혀 반응하지 않는 것으로 확인이 되어 본 발명의 앱타머가 가진 DCF에 대한 결합의 특이성이 증명되었다.

산업이용 가능성

[0063] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 디클로페낙에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 이용하면 수생태계에 존재하는 극미량의 잔류 디클로페낙을 보다 민감하게 검출할 수 있다. 또한 본 발명의 DNA 앱타머를 포함하는 잔류 의약품(디클로페낙) 제거방법 및 장치를 이용하여 극소량의 디클로페낙이 포함되어 있는 시료에서 디클로페낙만을 선택적으로 제거할 수 있다. 따라서 수생태계에 존재하는 잔류 의약품인 디클로페낙으로부터 식수의 안전성을 확보하고 생태계를 보호하며 또한 생물농축현상 등으로부터 인간을 보호하는 데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 디클로페낙(diclofenac)과 카운터 타겟(counter target)의 구조를 도시한 것이다.

[0065] 도 2는 본 발명에 따른 디클로페낙에만 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 개발하는 방법의 모식도이다.

[0066] 도 3은 본 발명에 따른 각각의 선별(selection)에서 DCF가 고정된 자성비드로부터 용리된 ssDNA의 퍼센트를 나타낸다.

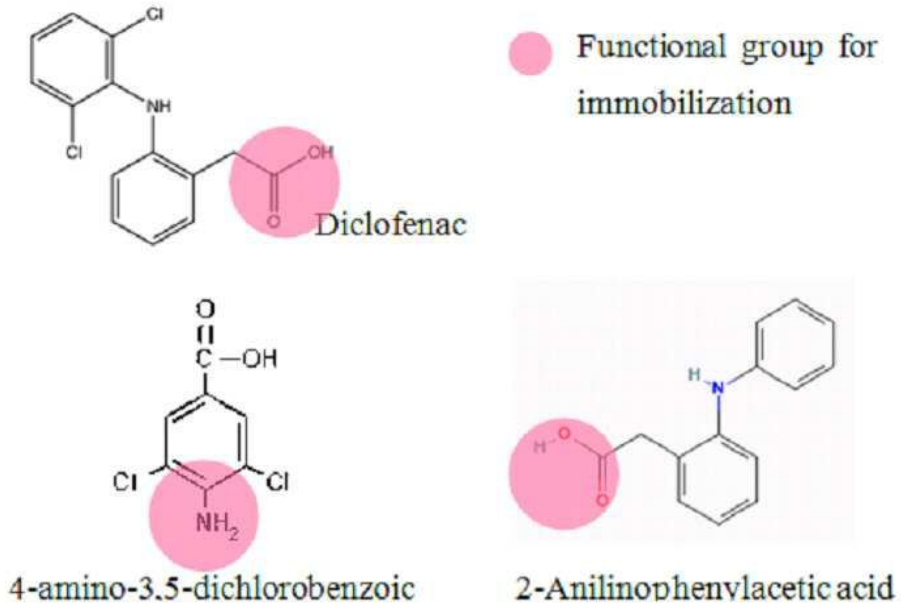
[0067] 도 4 내지 도 48은 본 발명에 따른 디클로페낙 결합 특이적인 45종의 DNA 앱타머의 염기서열을 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 2차 구조의 모식도이다.

[0068] 도 49 내지 도 52는 디클로페낙과의 결합력이 가장 큰 4종의 디클로페낙-앱타머의 결합곡선을 나타낸다.

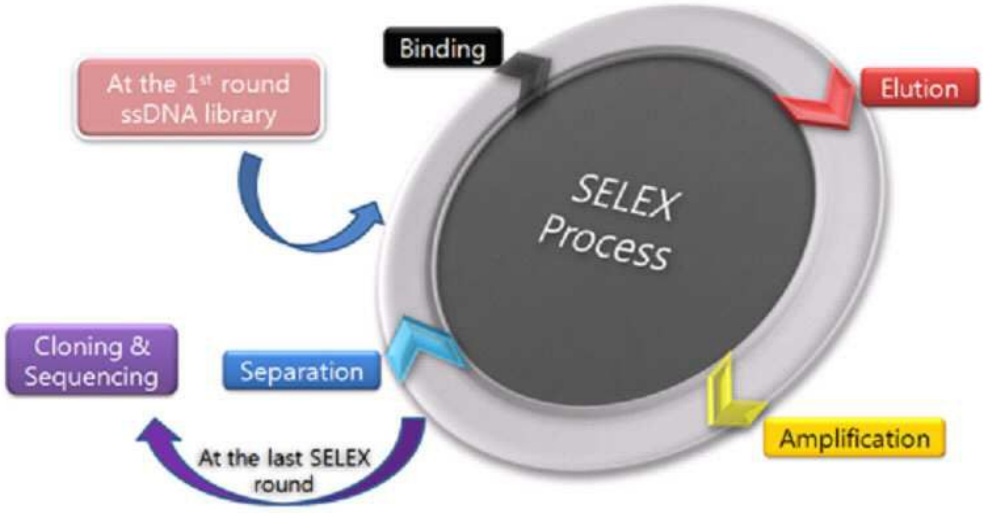
[0069] 도 53은 본 발명에 따른 앱타머가 디클로페낙에 대해서만 특이성을 나타내고 비슷한 구조를 가지는 다른 물질(counter)에 대해서는 친화도가 없음을 보여주는 그래프이다.

도면

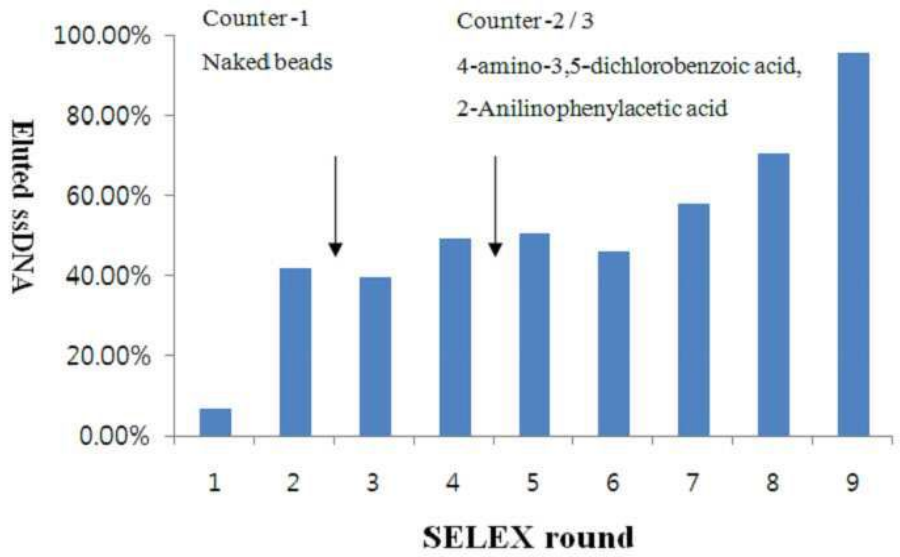
도면1


Cl
NH
Cl
OH
O
Diclofenac
Functional group for immobilization
O
C—OH
Cl
Cl
NH2
4-amino-3,5-dichlorobenzoic
H
N
H
O
O
2-Anilinophenylacetic acid

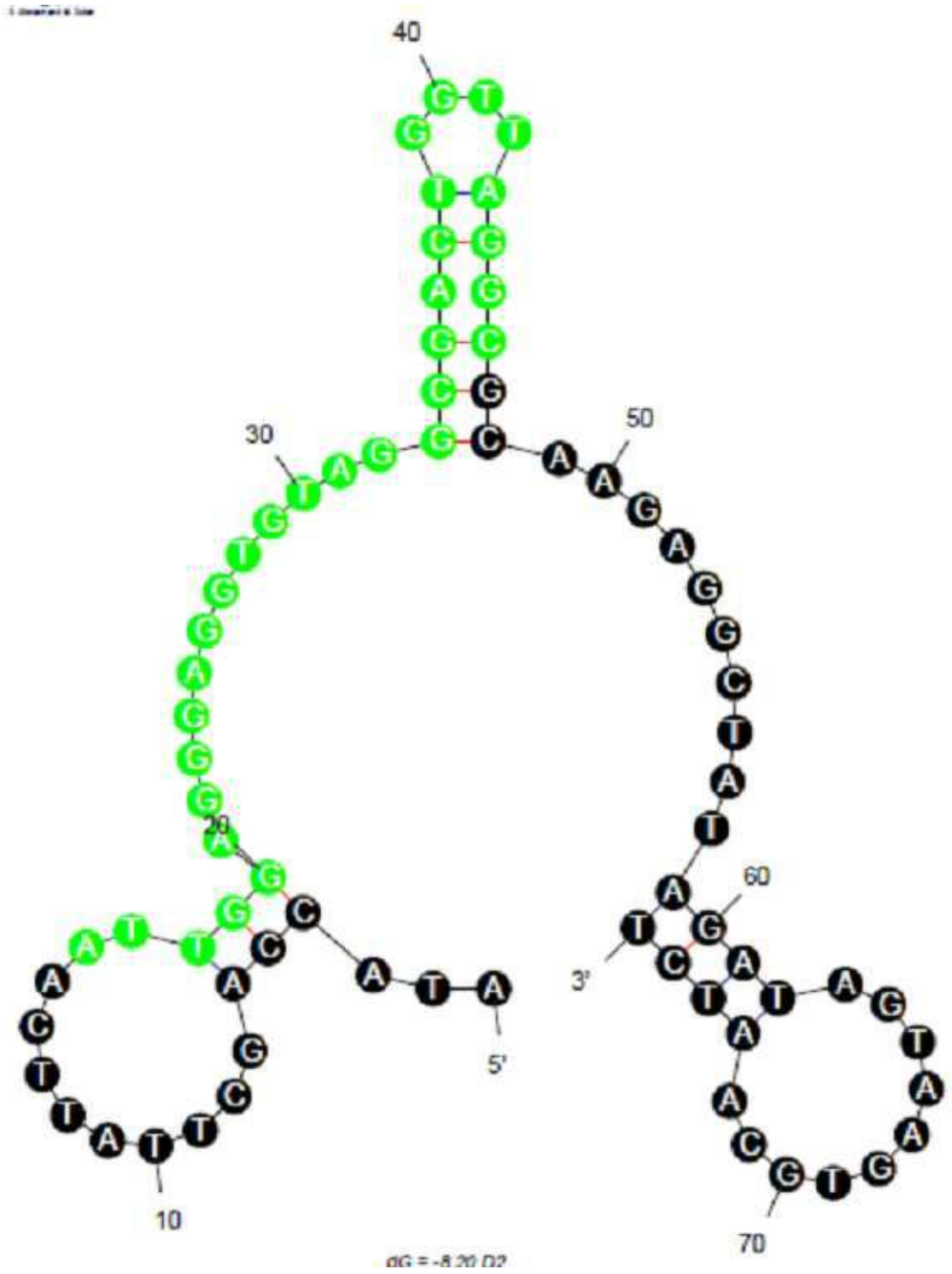
도면2


Binding
At the 1st round ssDNA library
Elution
SELEX Process
Cloning & Sequencing
Separation
Amplification
At the last SELEX round

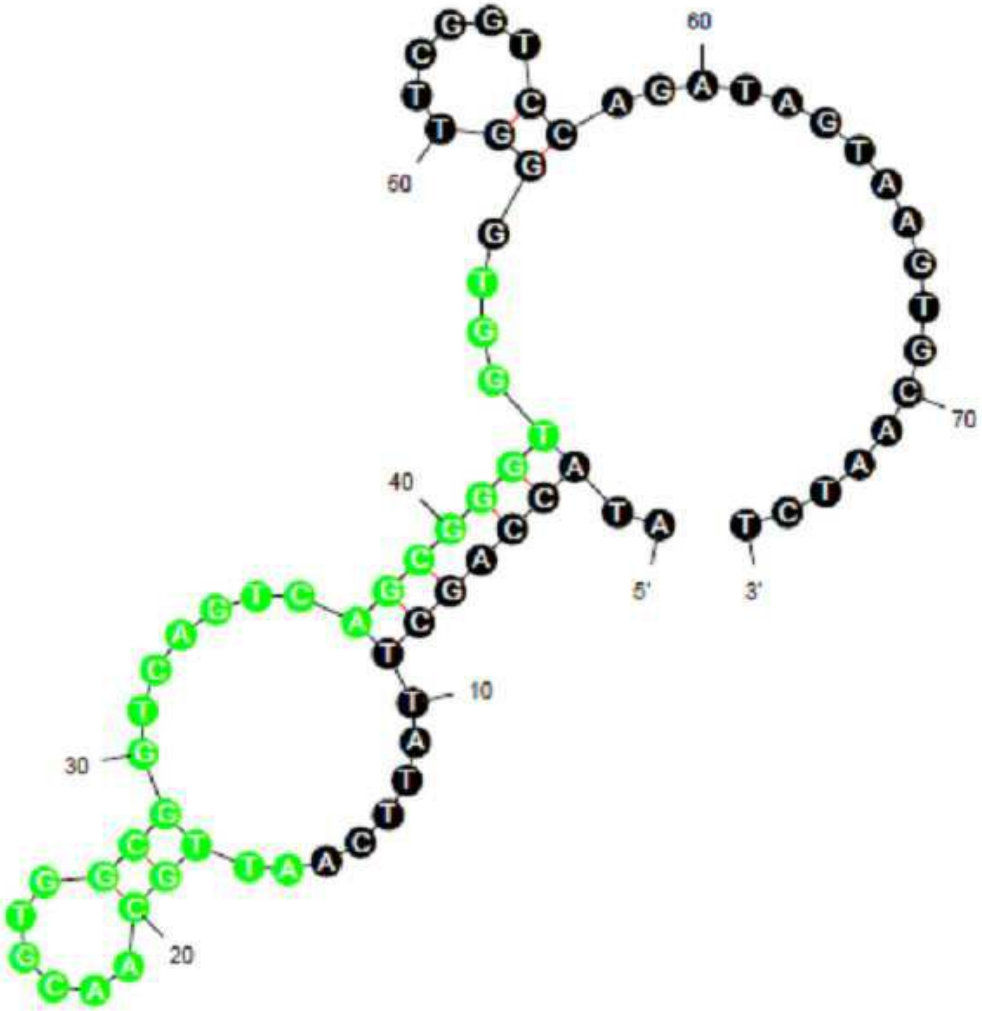
도면3


Counter-1
Naked beads
Counter-2 / 3
4-amino-3,5-dichlorobenzoic acid,
2-Anilinophenylacetic acid
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
Eluted ssDNA
1
2
3
4
5
6
7
8
9
SELEX round

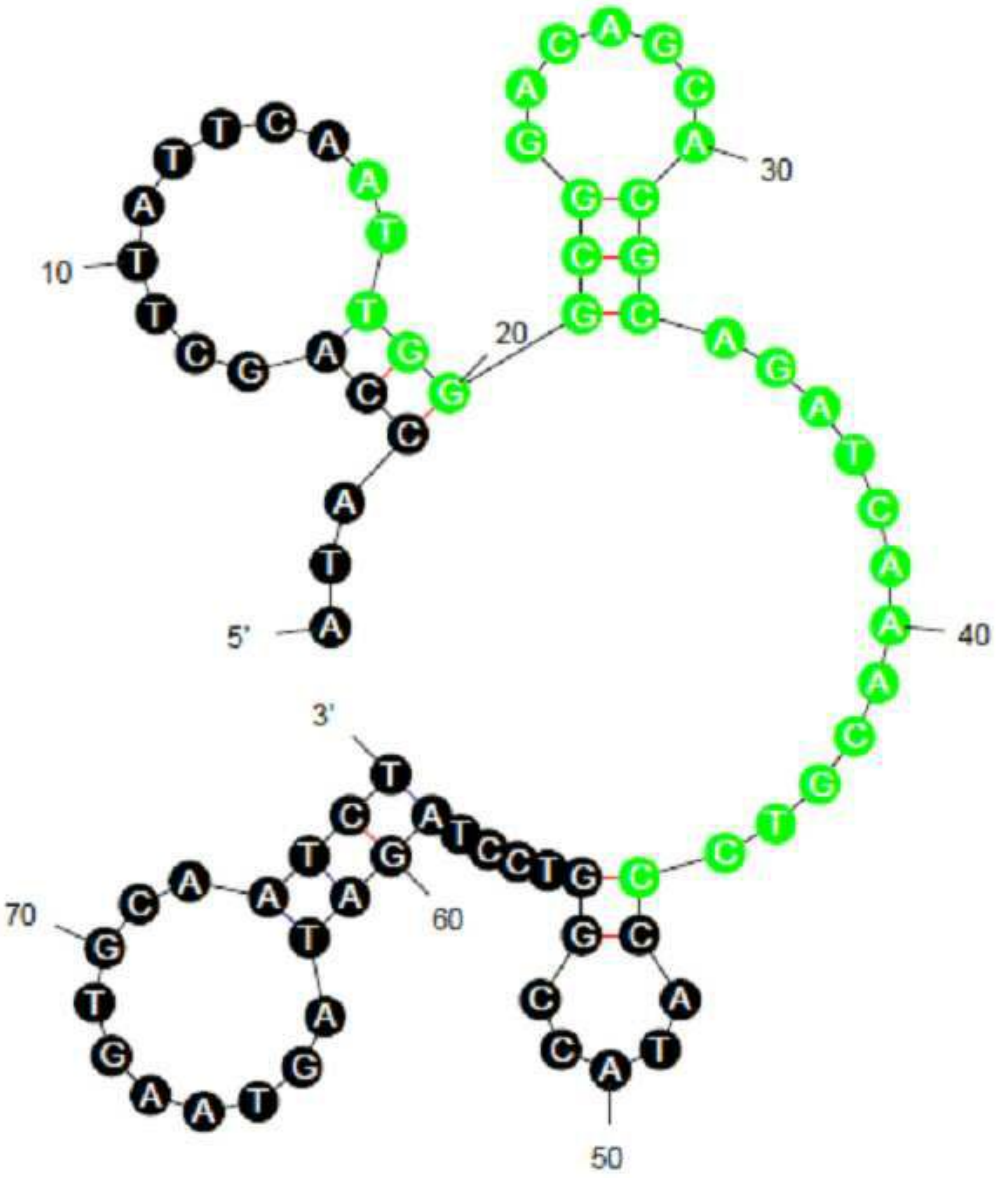
도면4



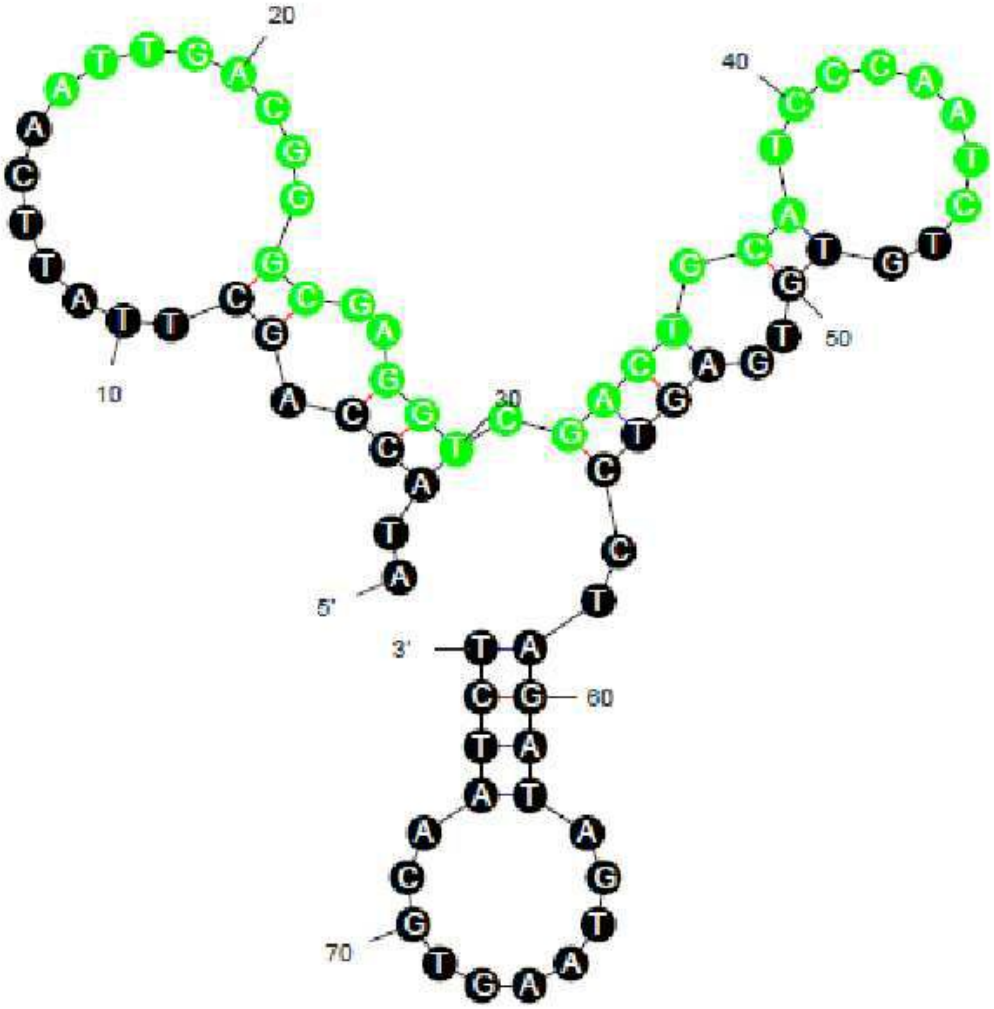
도면5



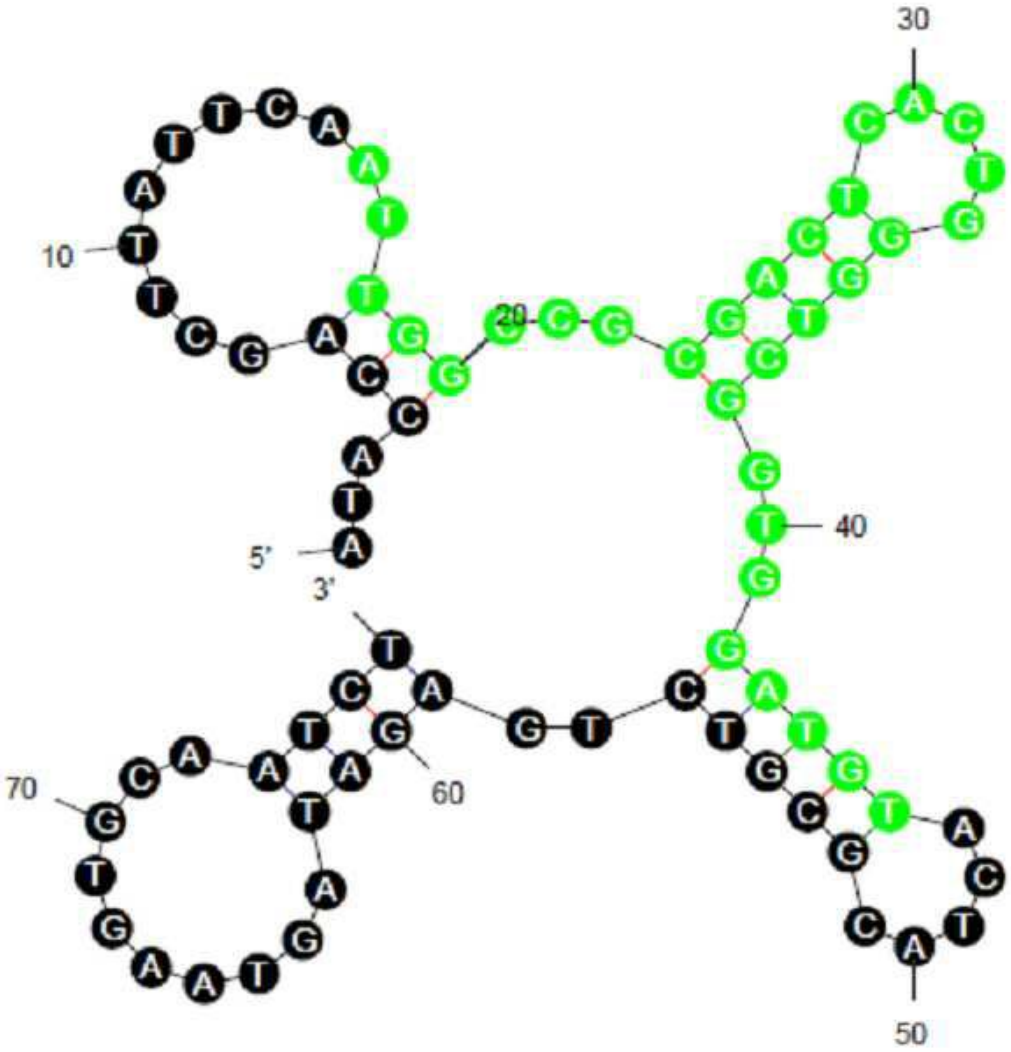
도면6



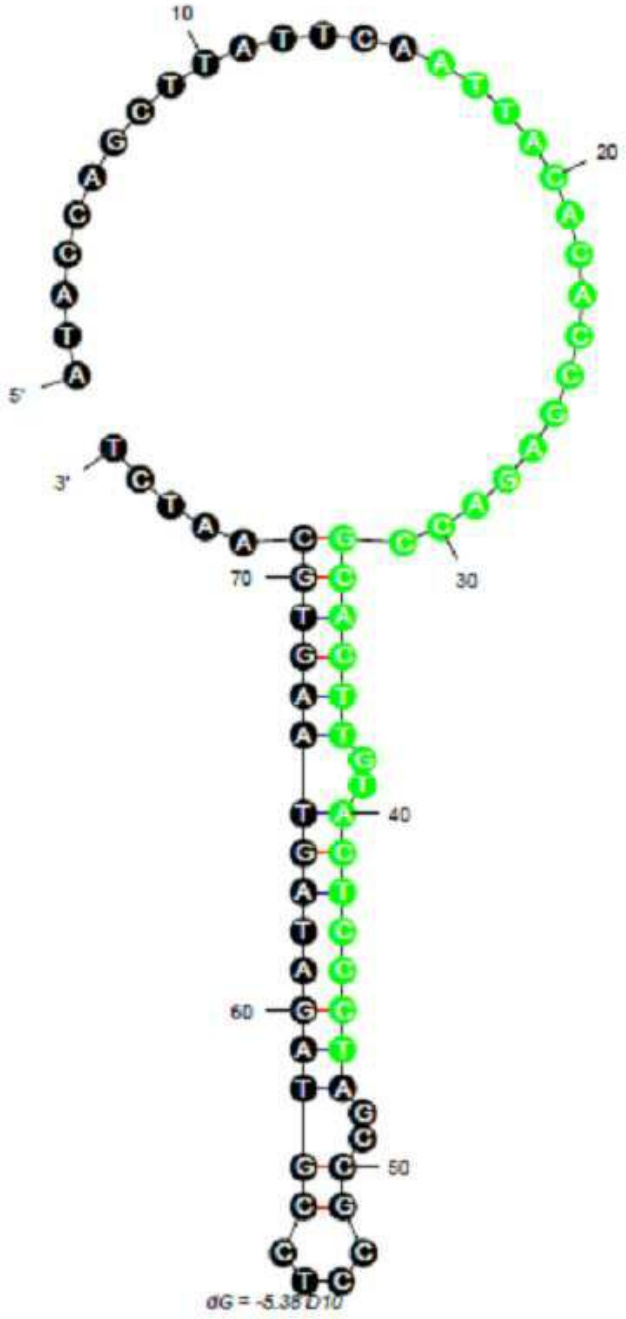
도면7



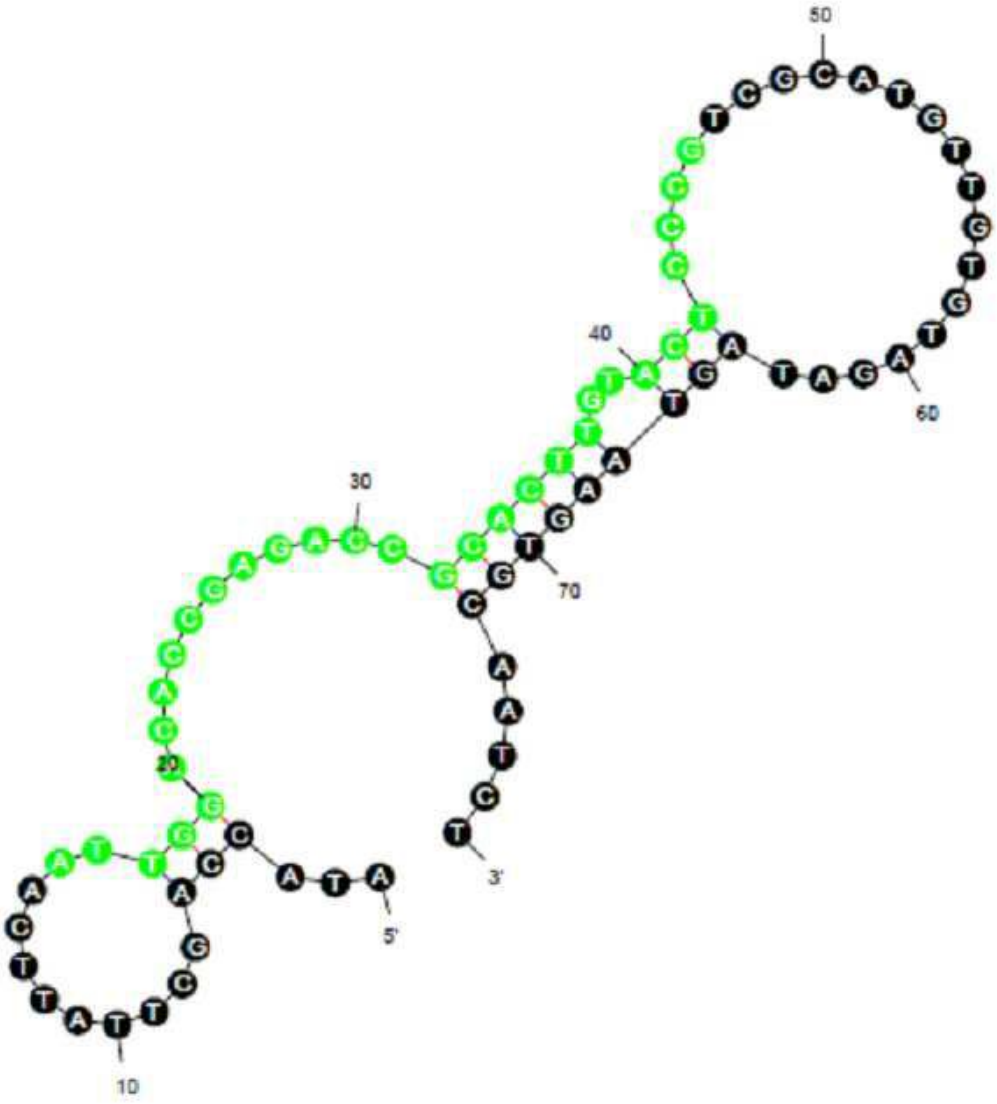
도면8



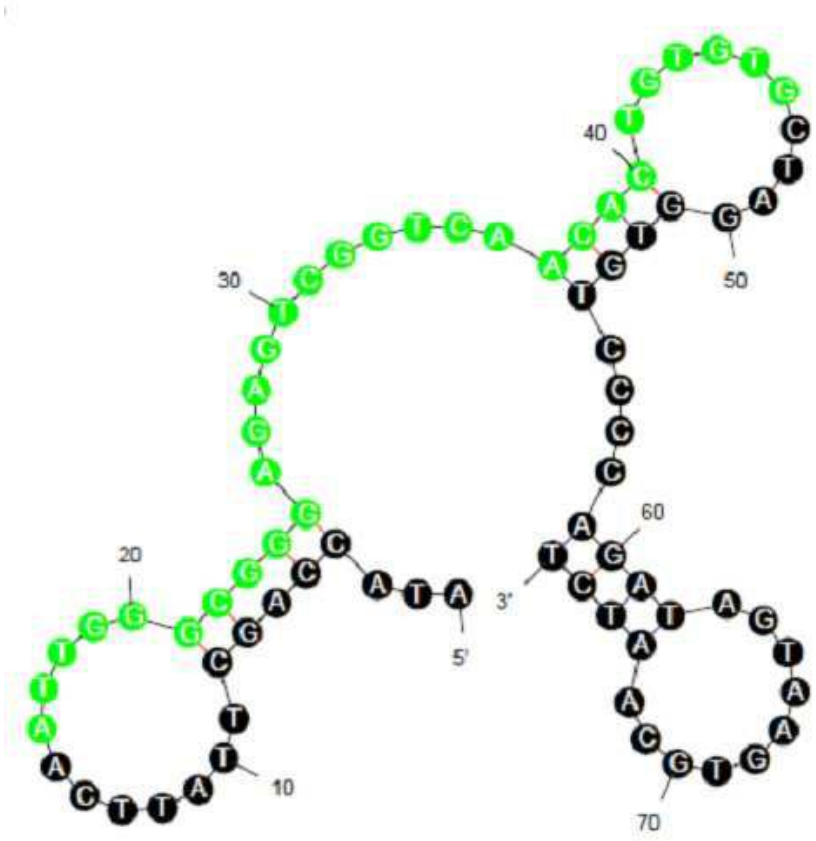
도면9



도면10



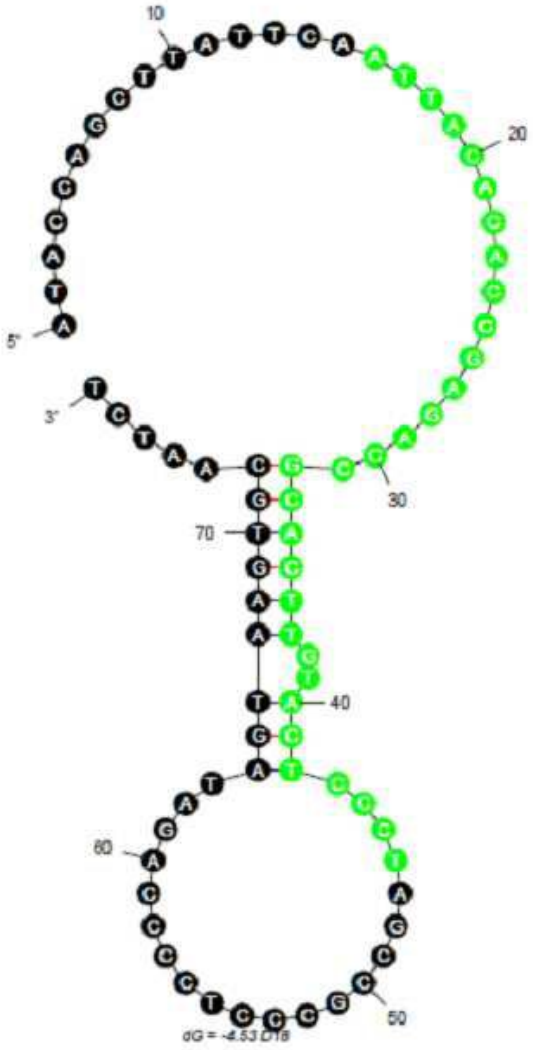
도면11



도면12



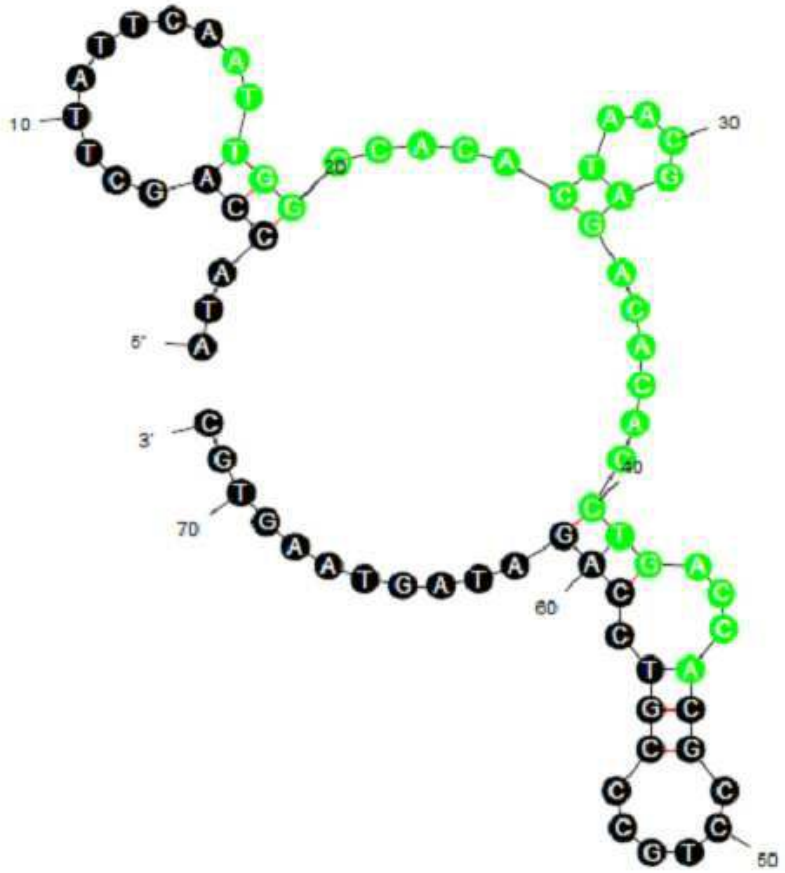
도면13



도면14



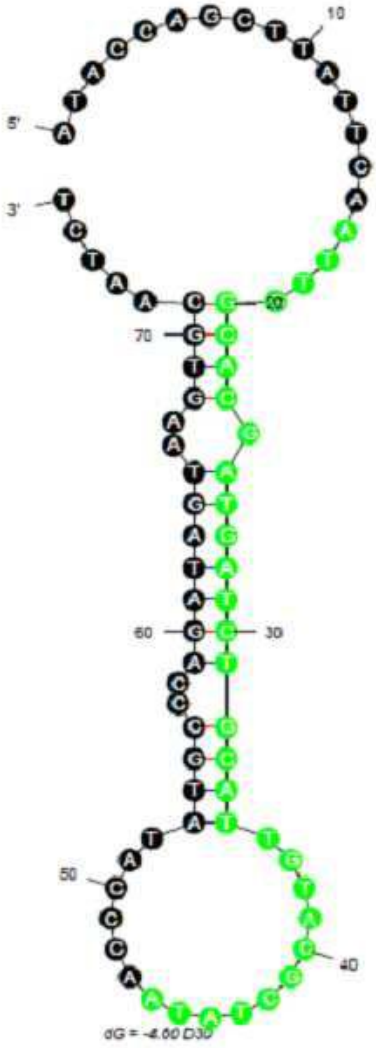
도면15



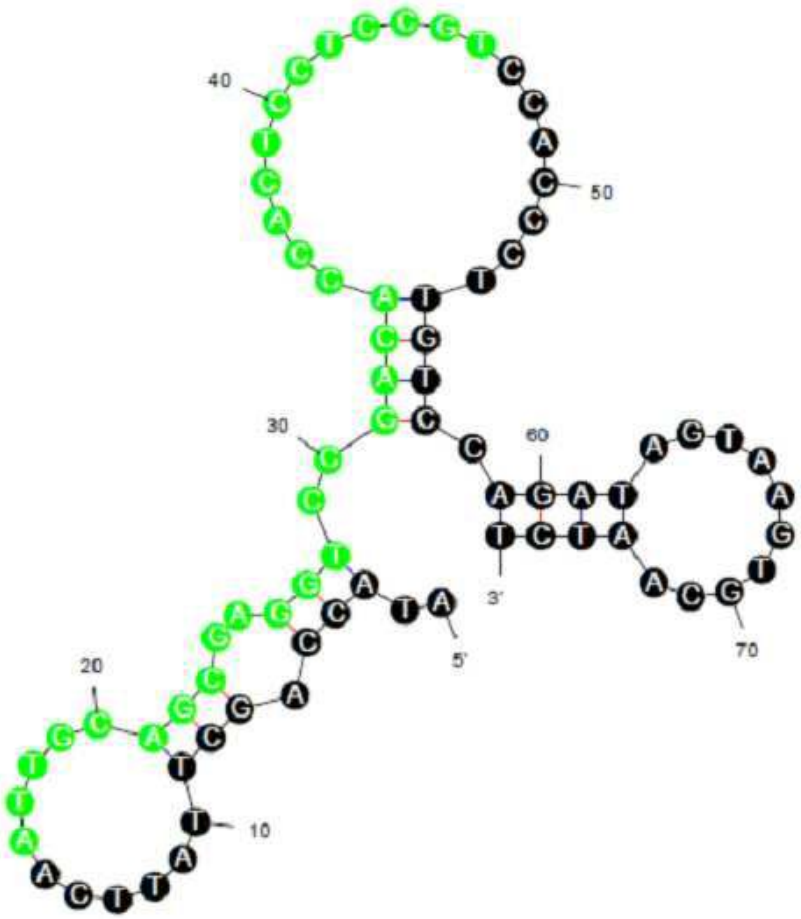
도면16



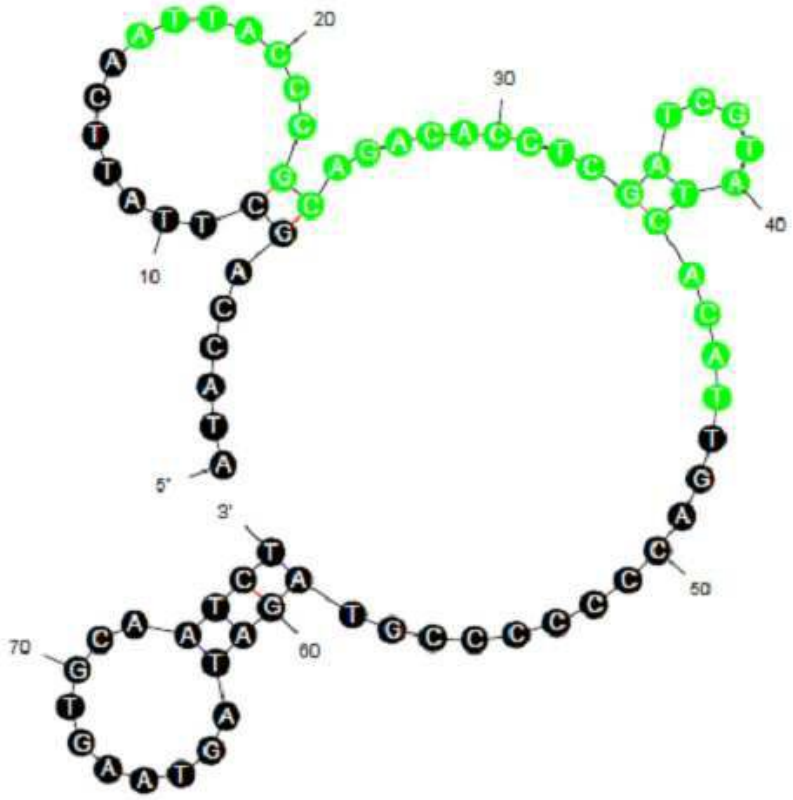
도면17



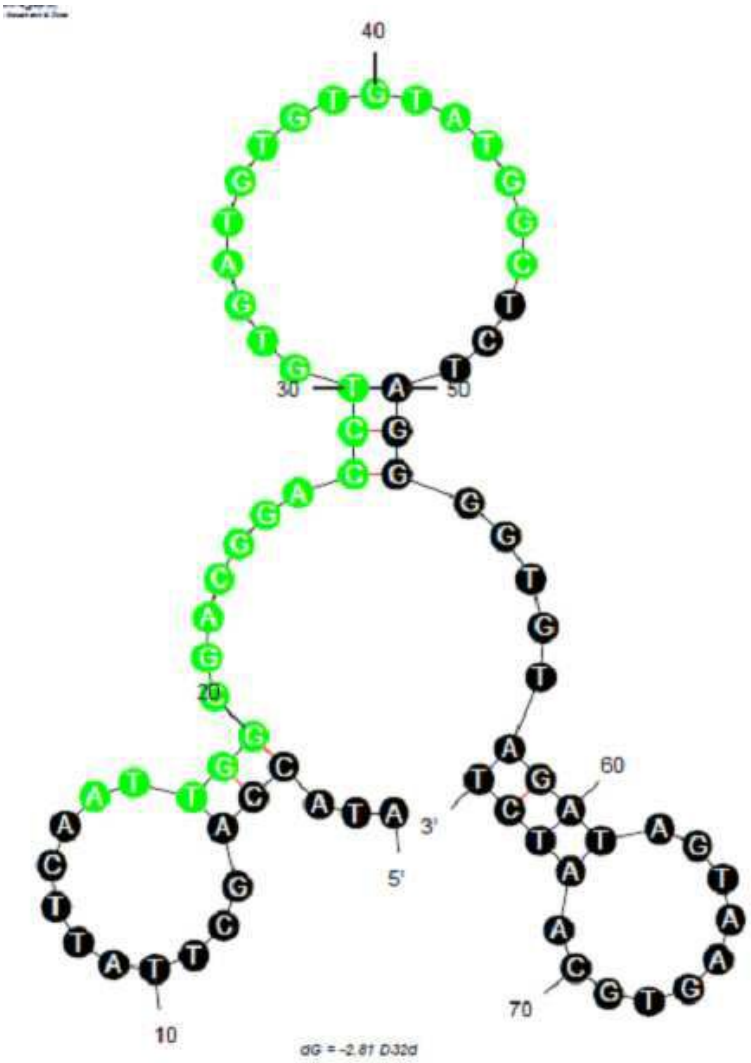
도면18



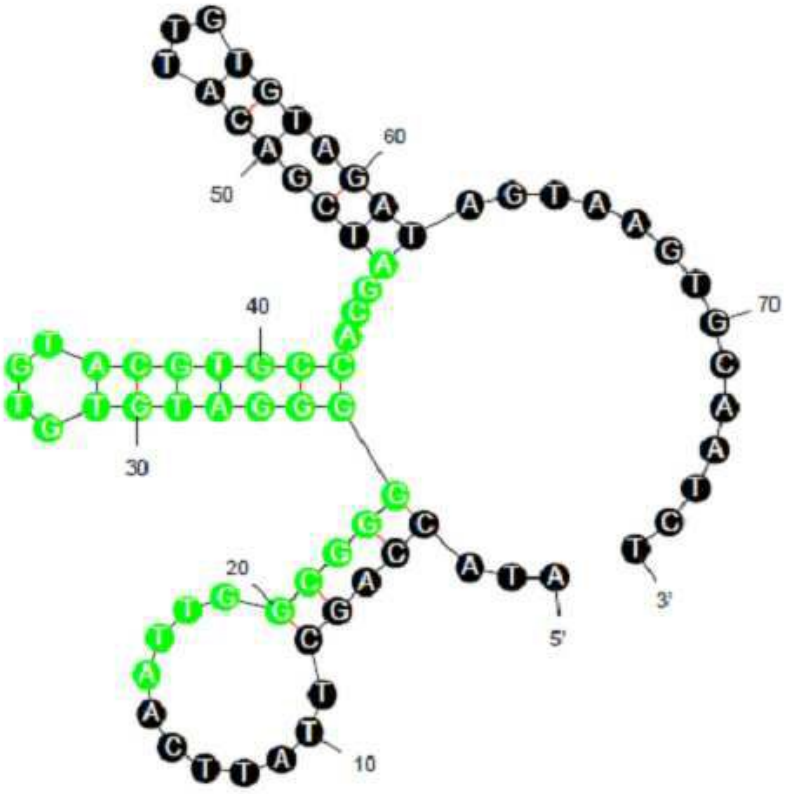
도면19



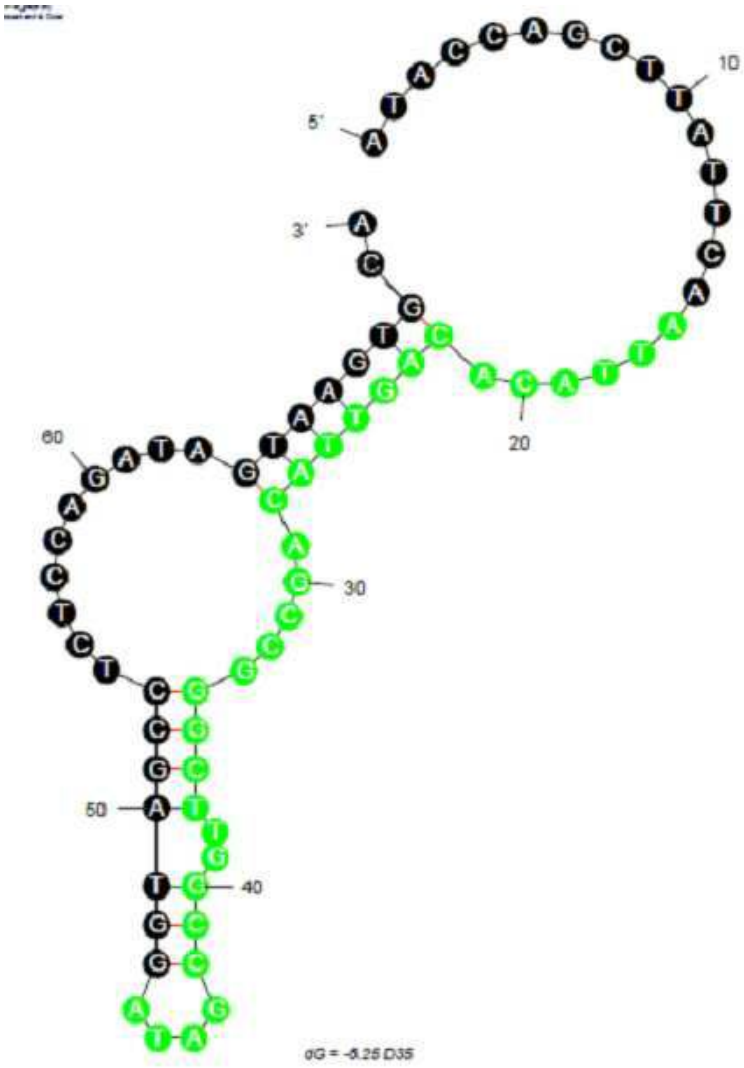
도면20



도면21



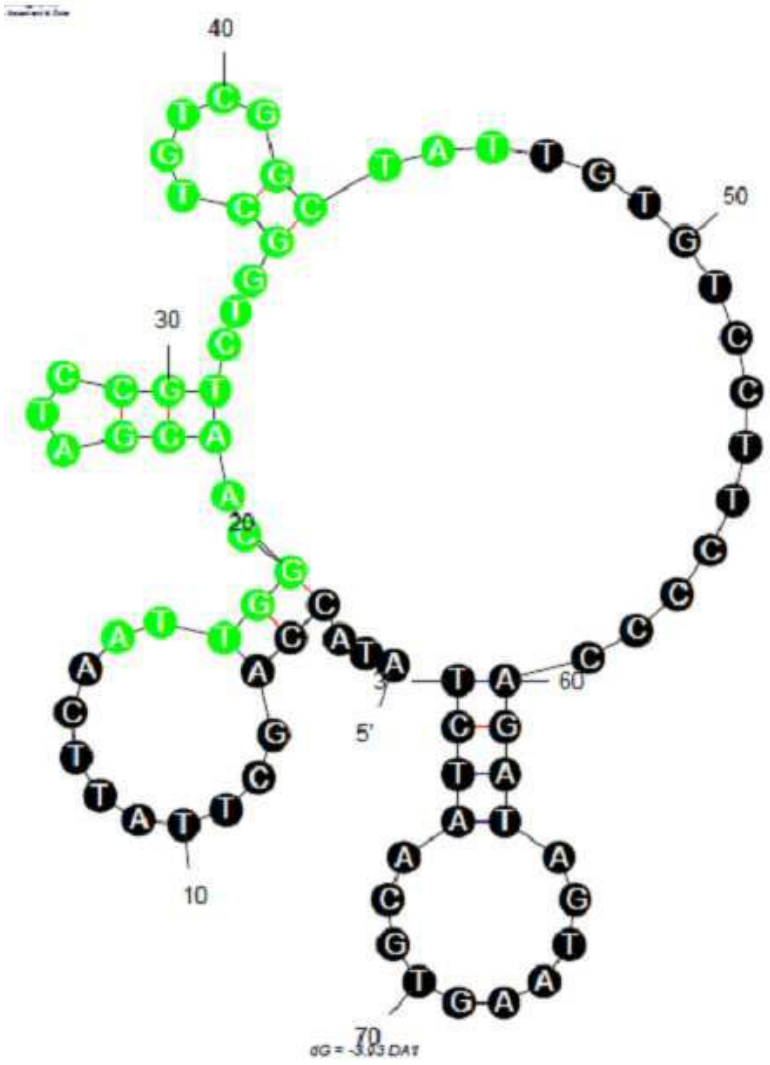
도면22



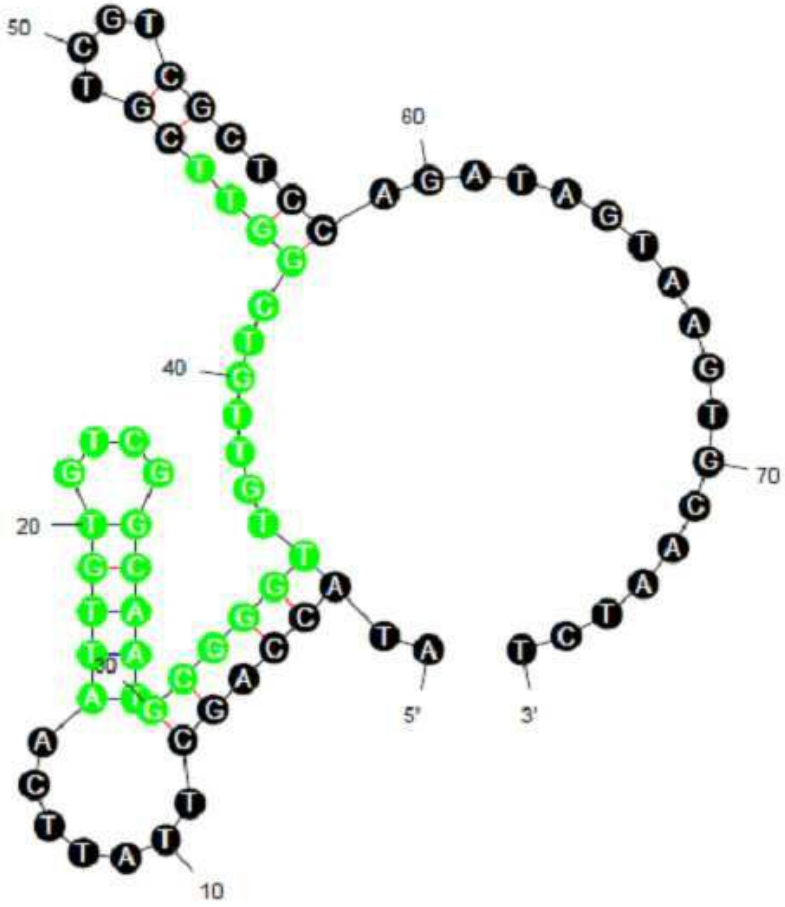
도면23



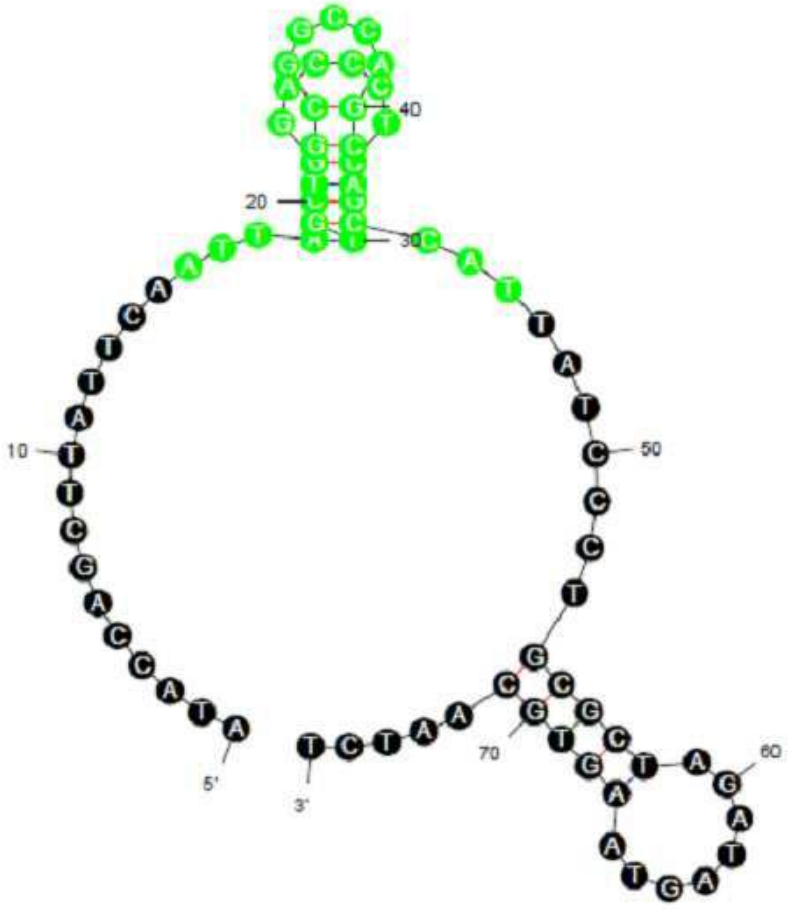
도면24



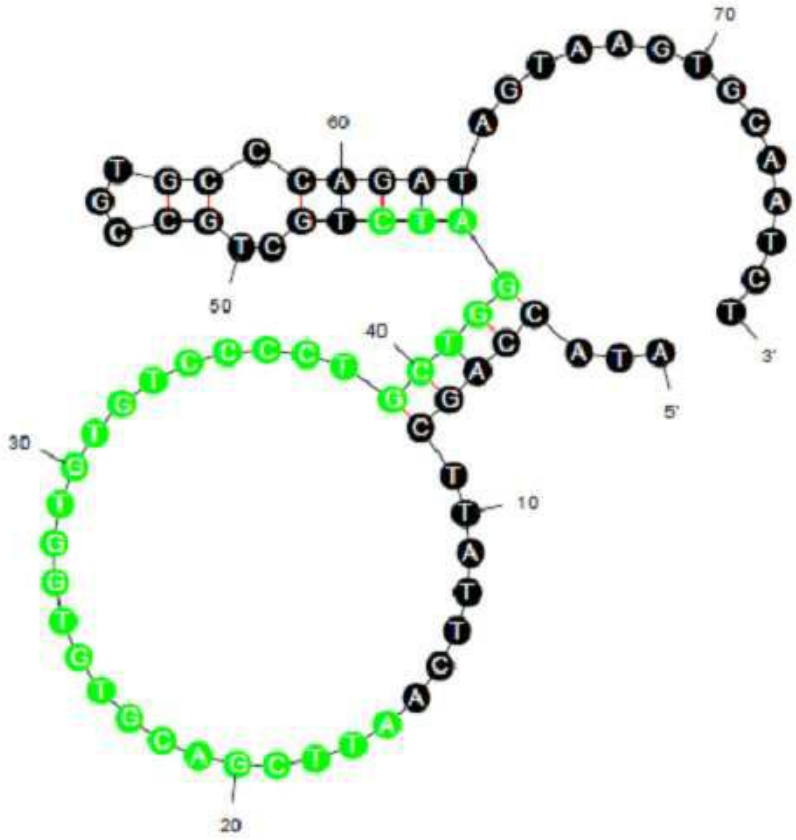
도면25



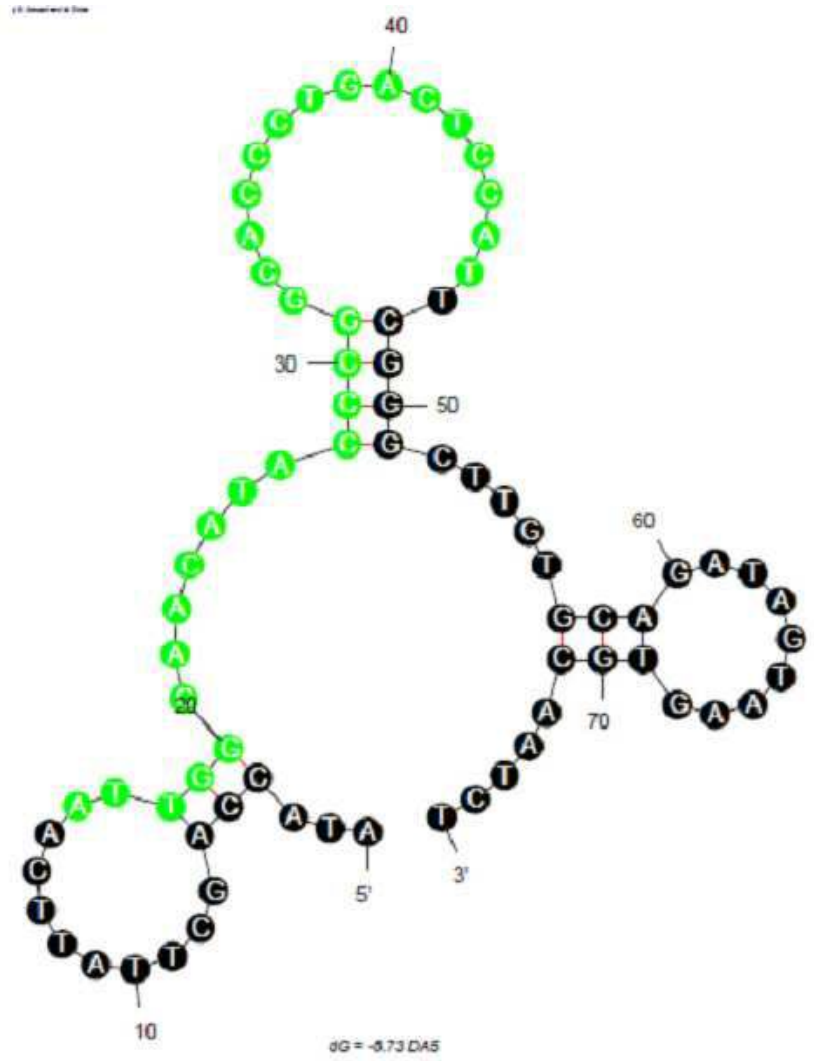
도면26



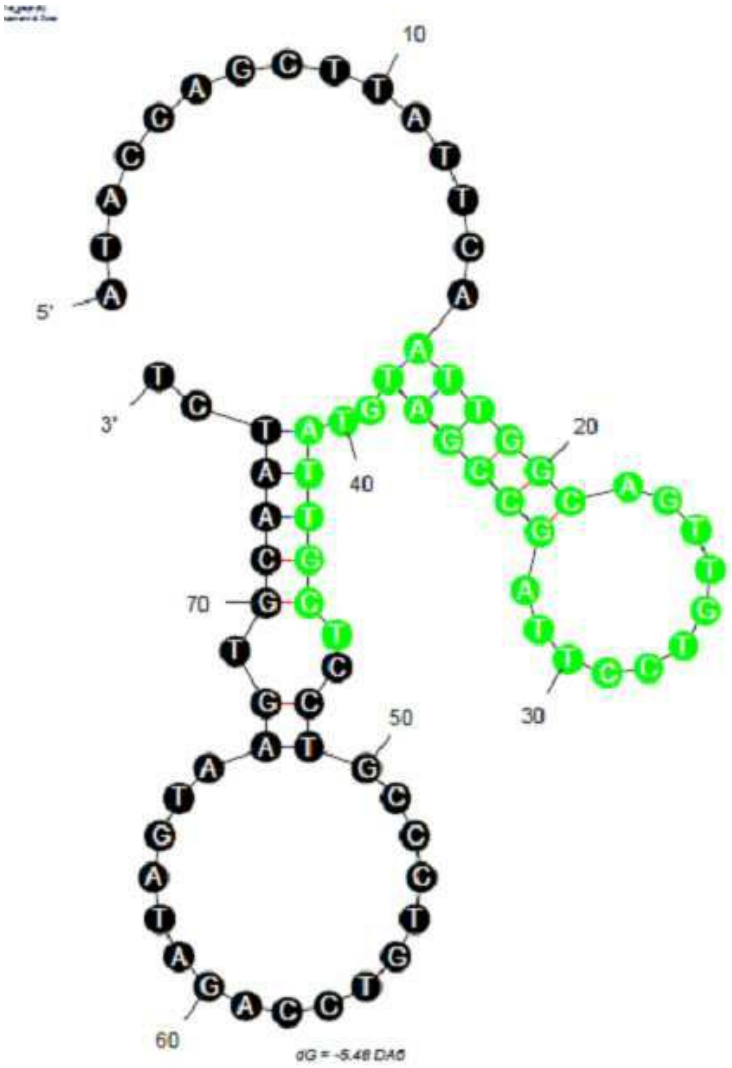
도면27



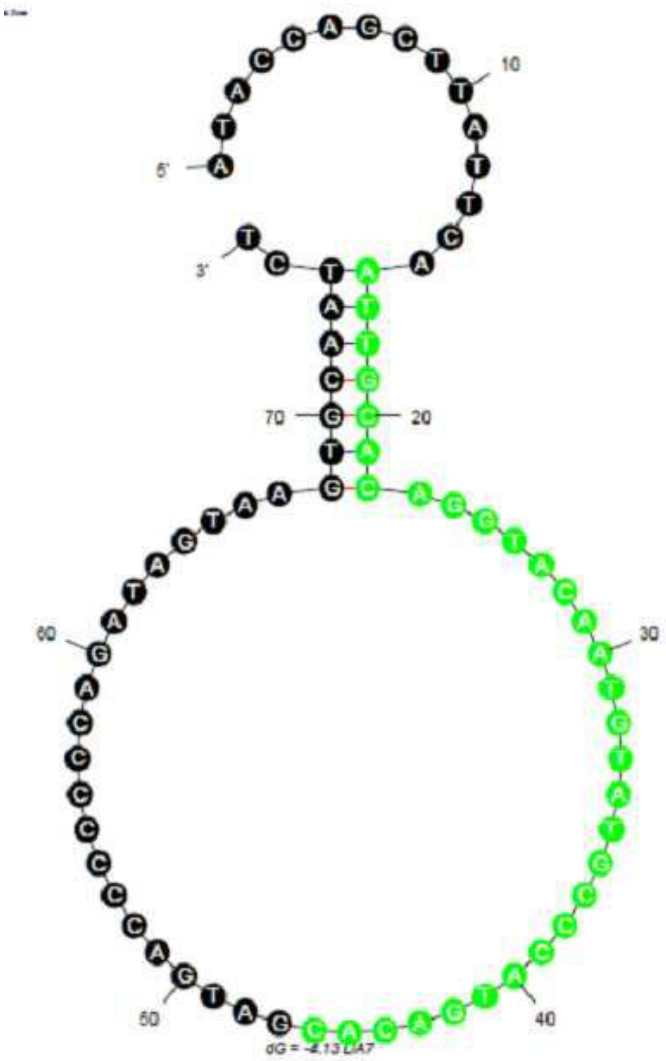
도면28



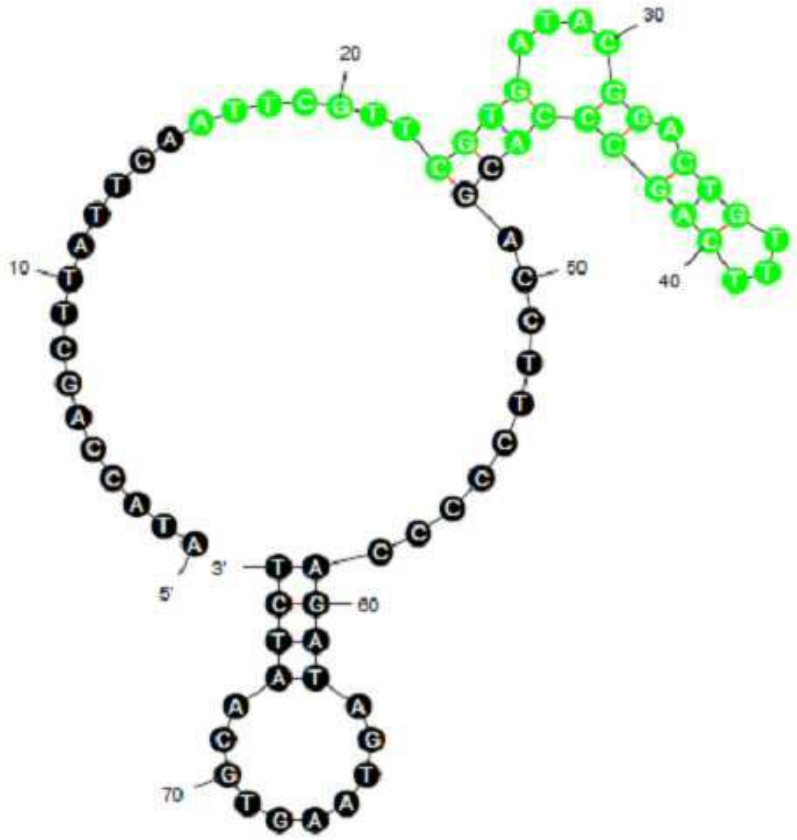
도면29



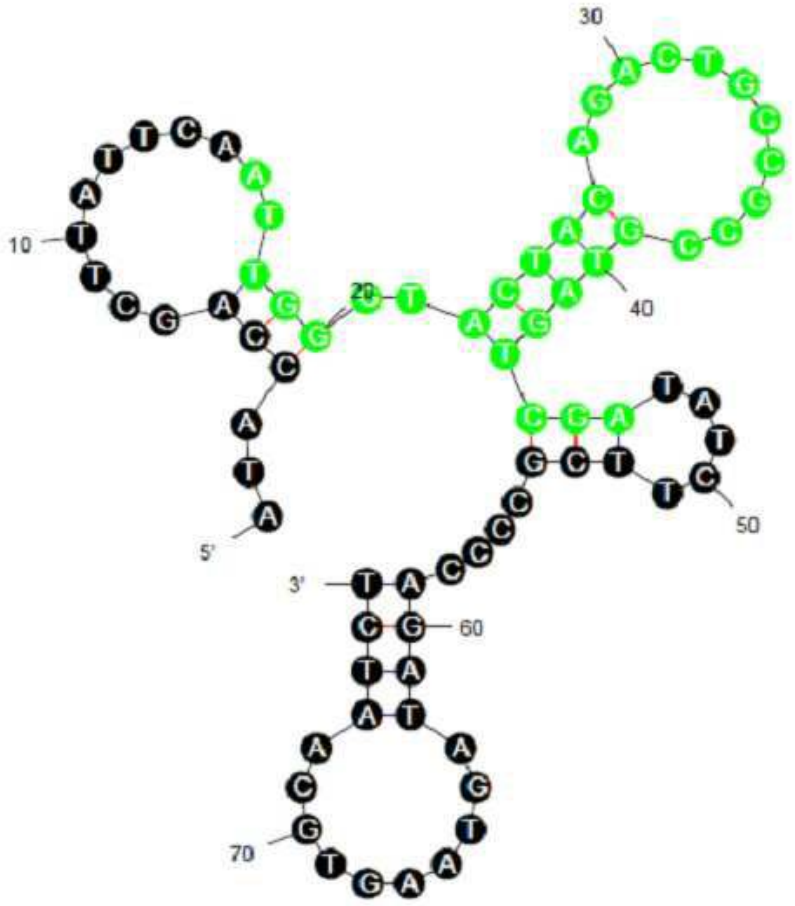
도면30



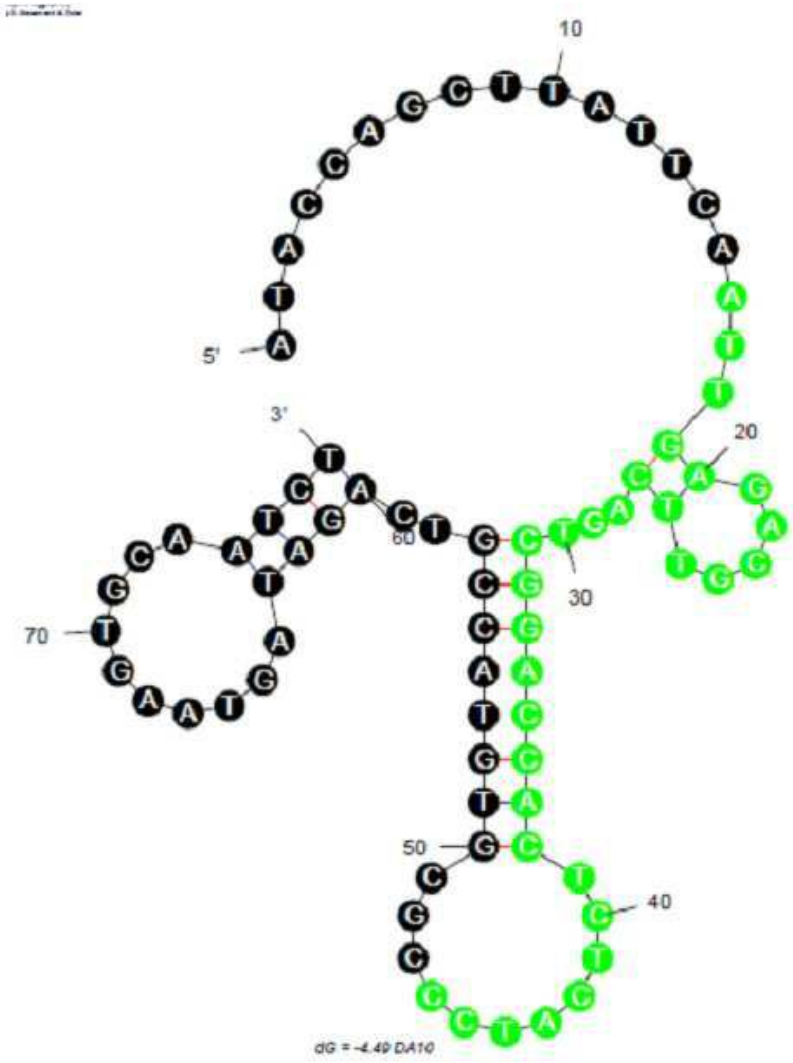
도면31



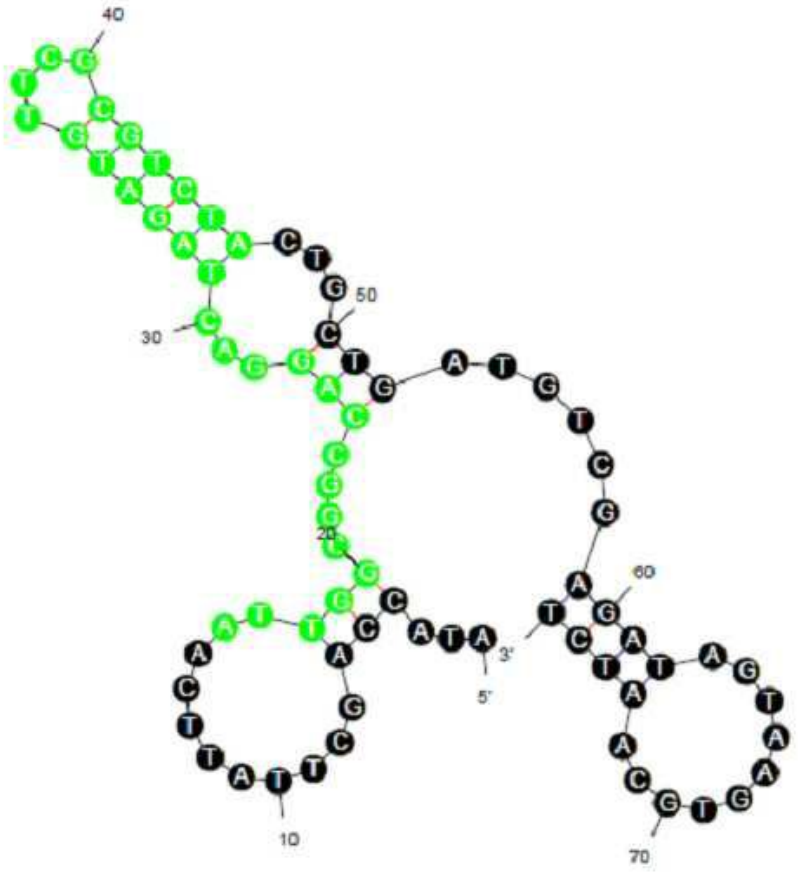
도면32



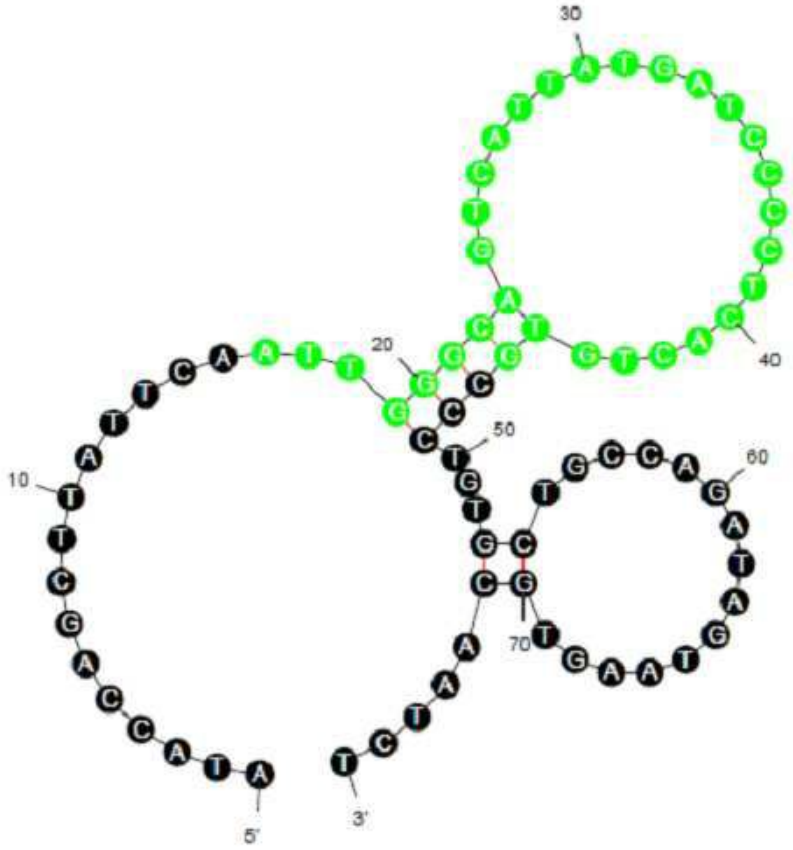
도면33



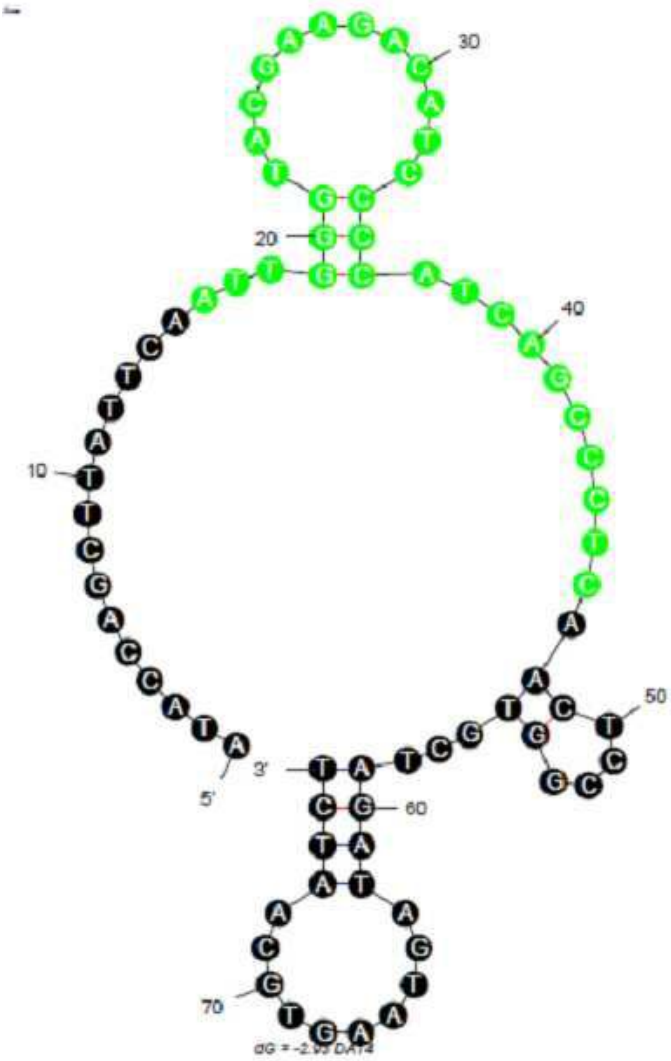
도면34



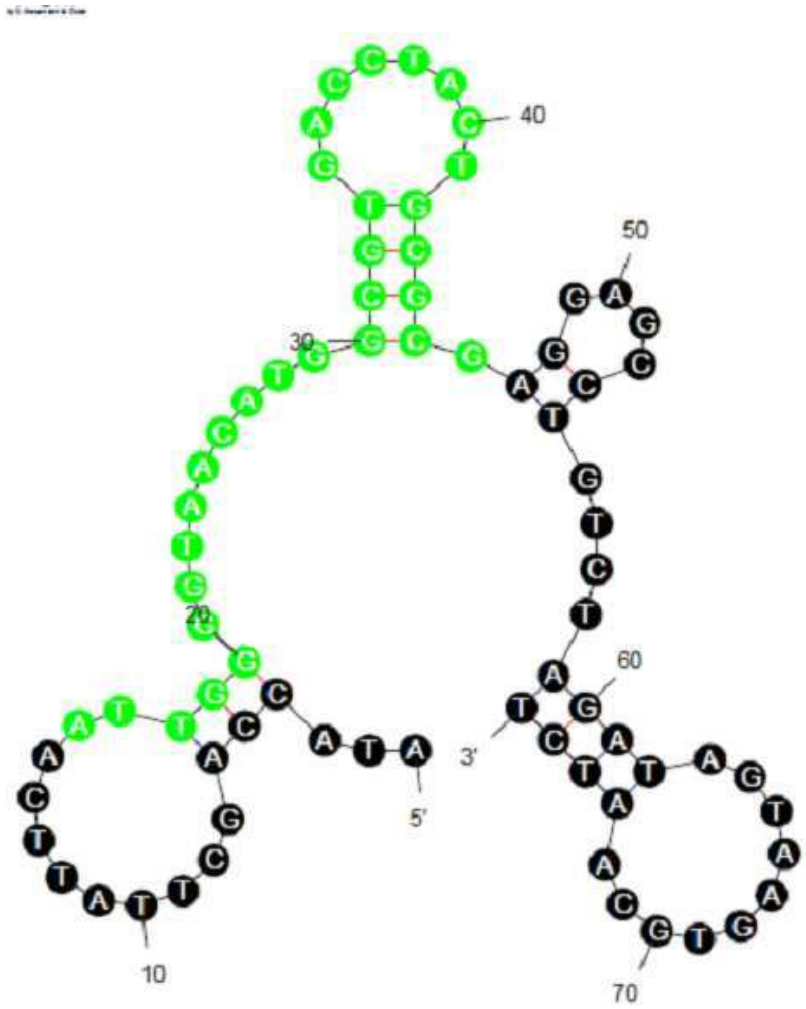
도면35



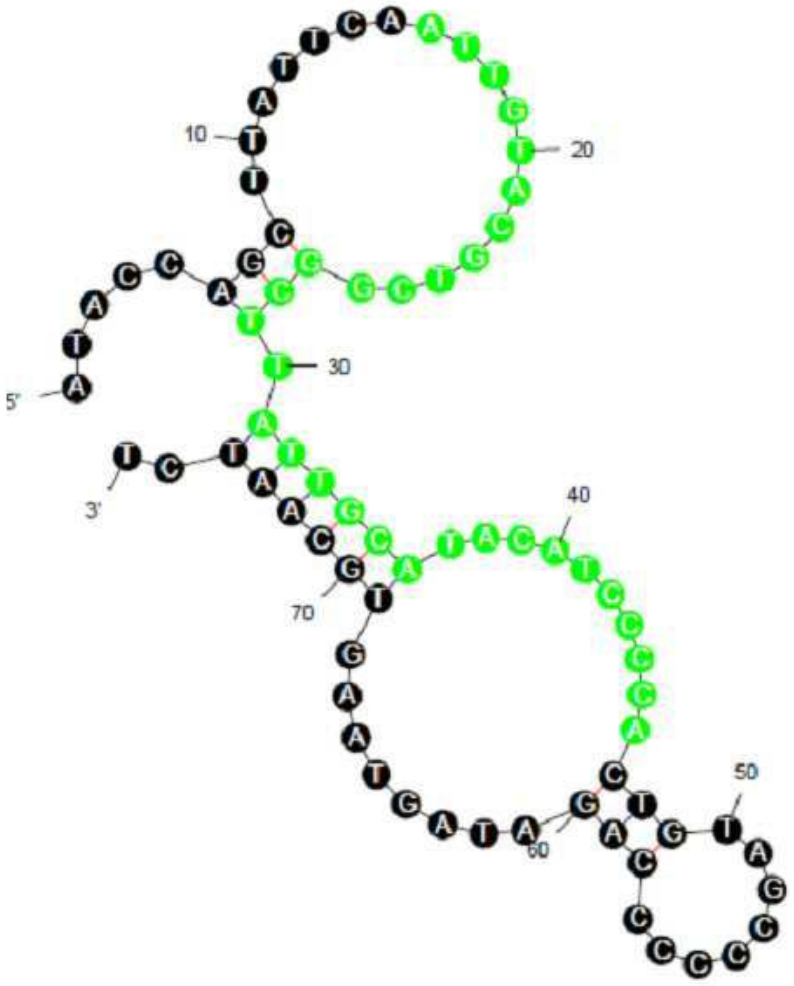
도면36



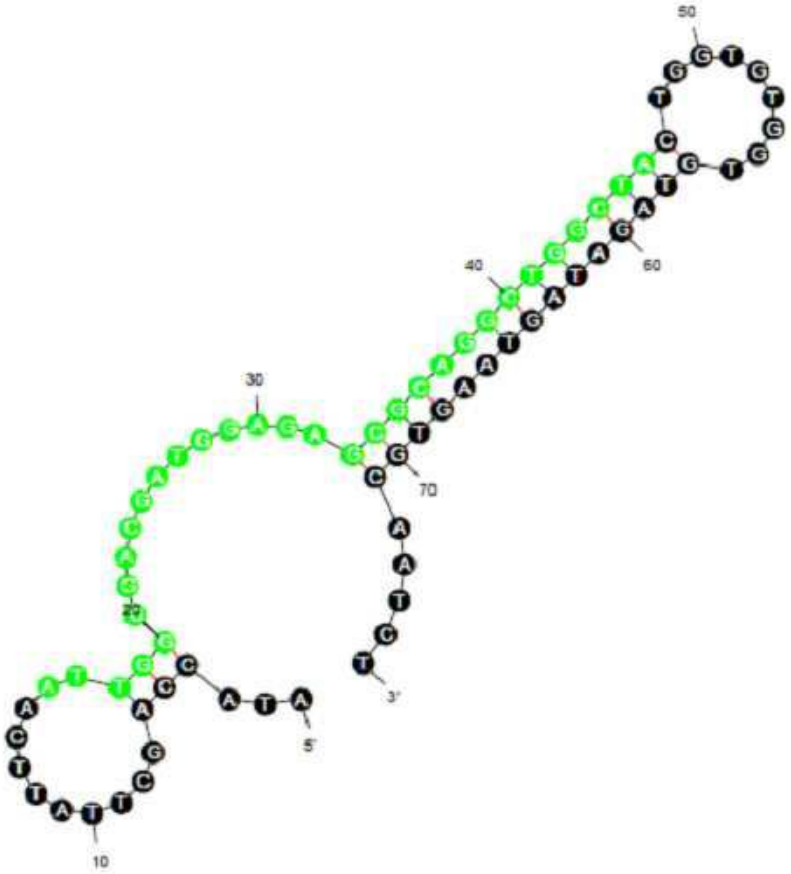
도면37



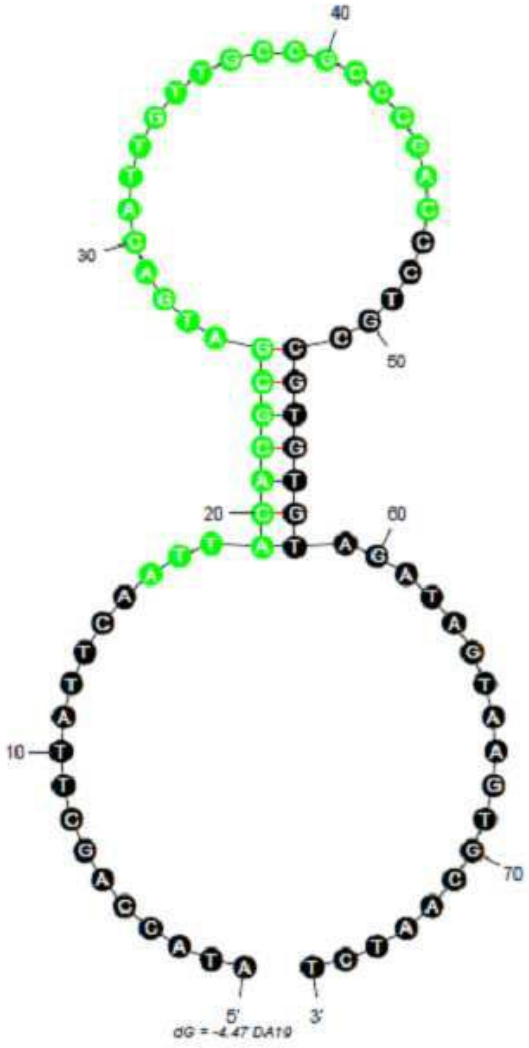
도면38



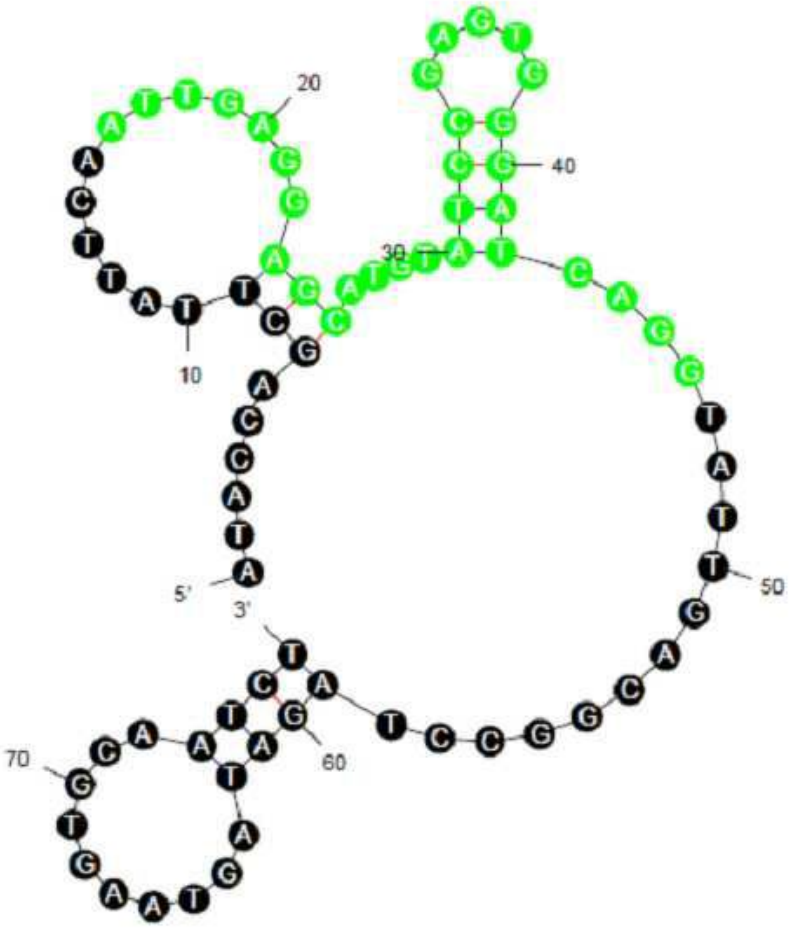
도면39



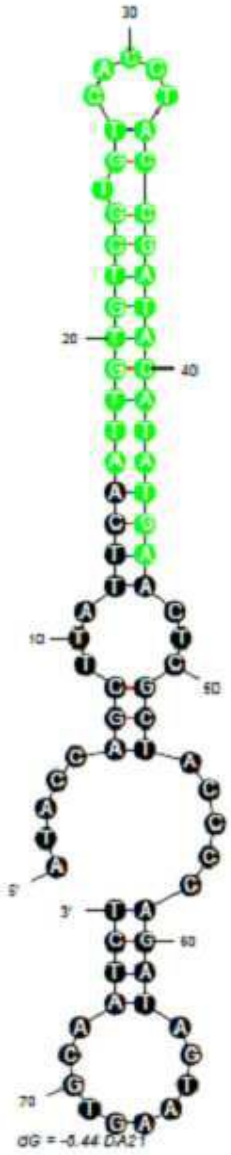
도면40



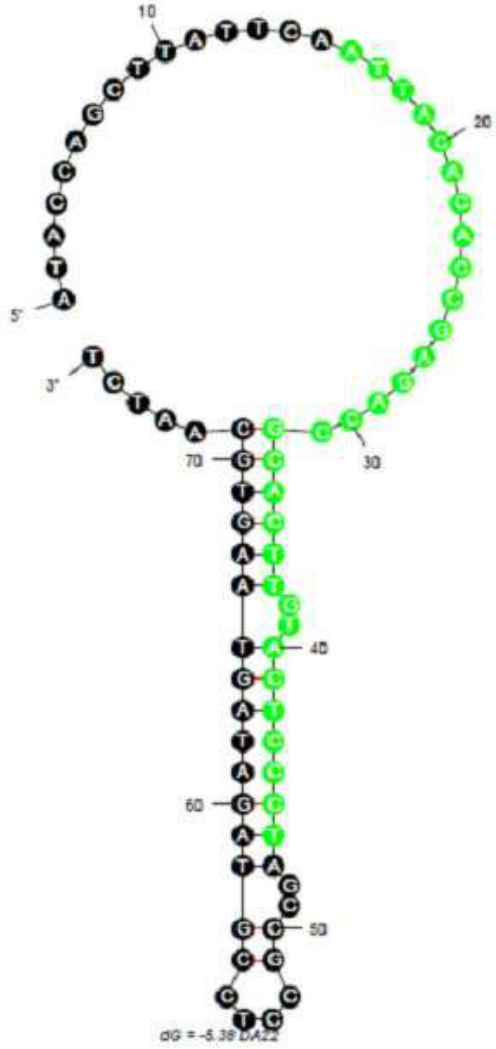
도면41



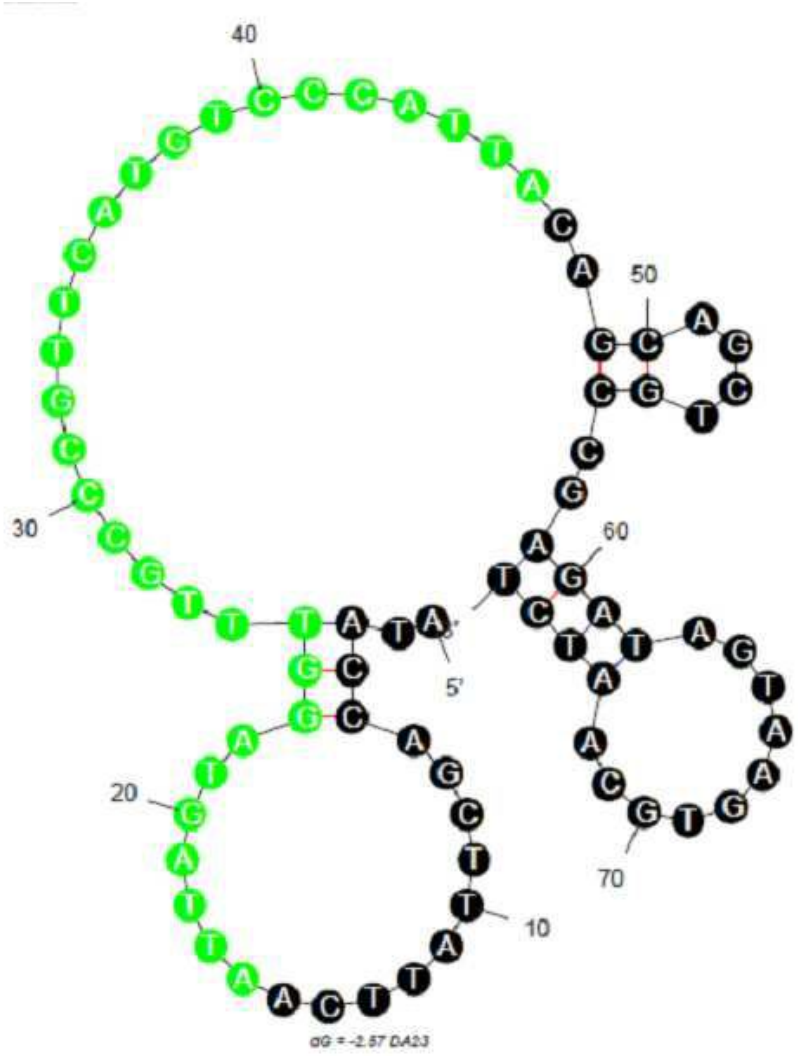
도면42



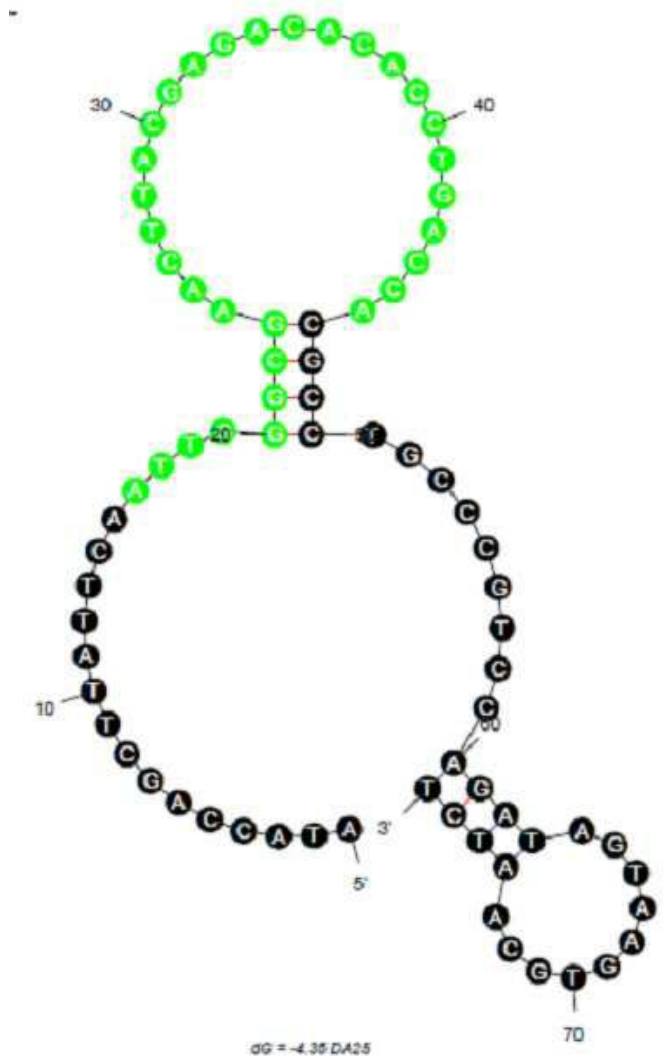
도면43



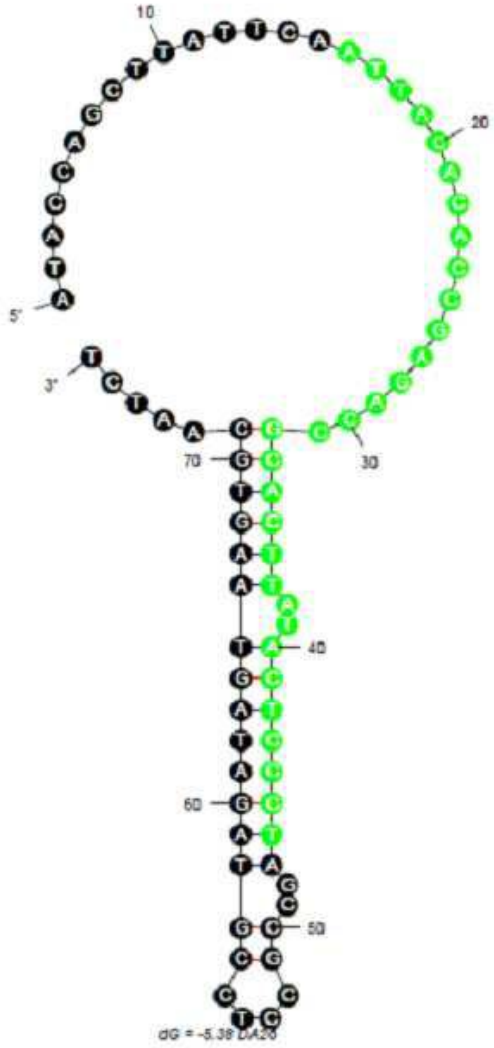
도면44



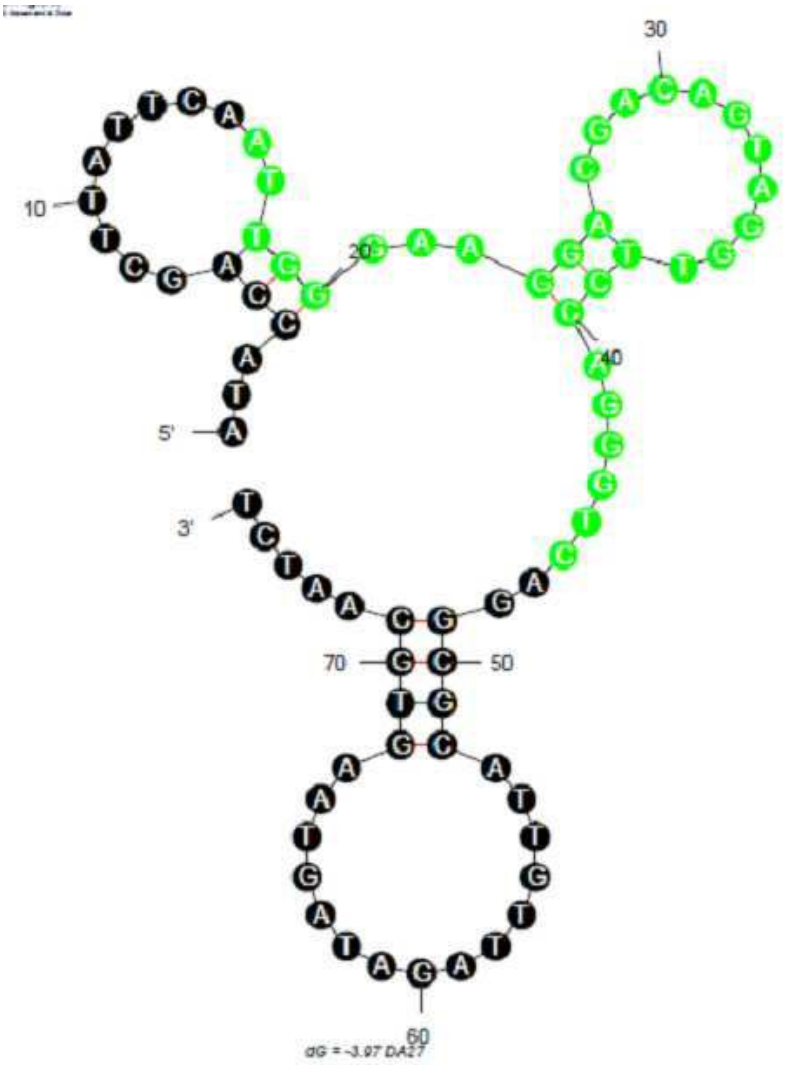
도면45



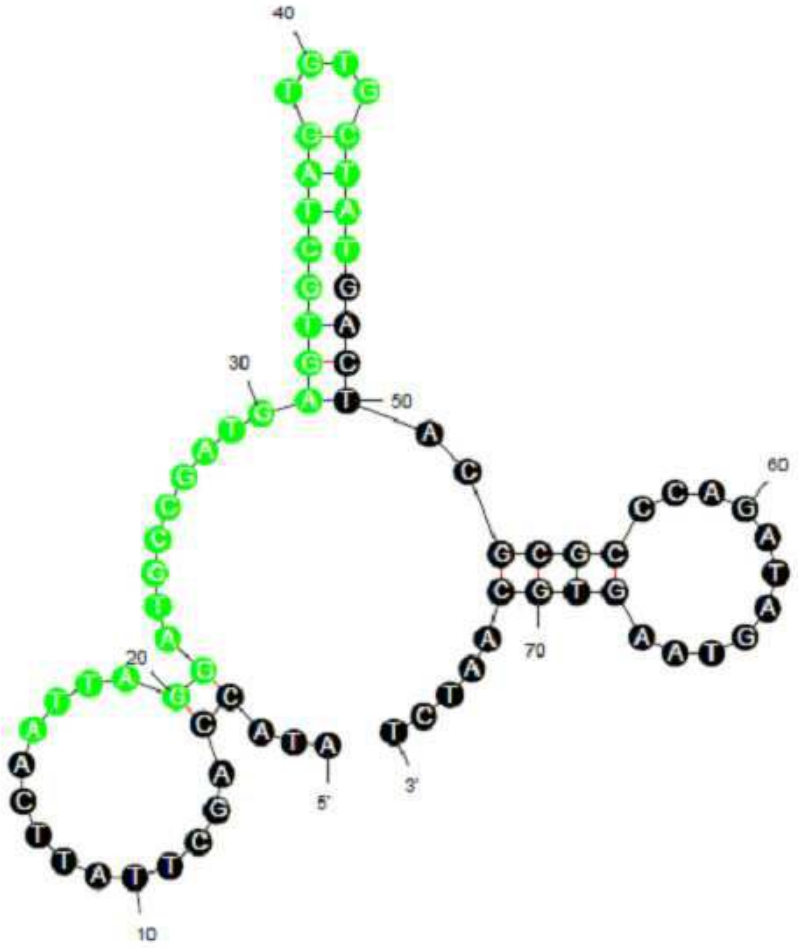
도면46



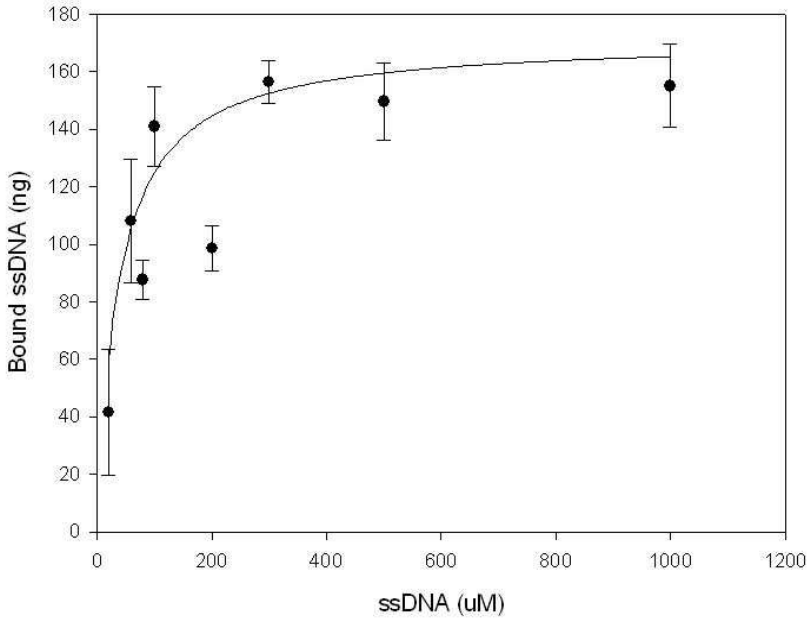
도면47



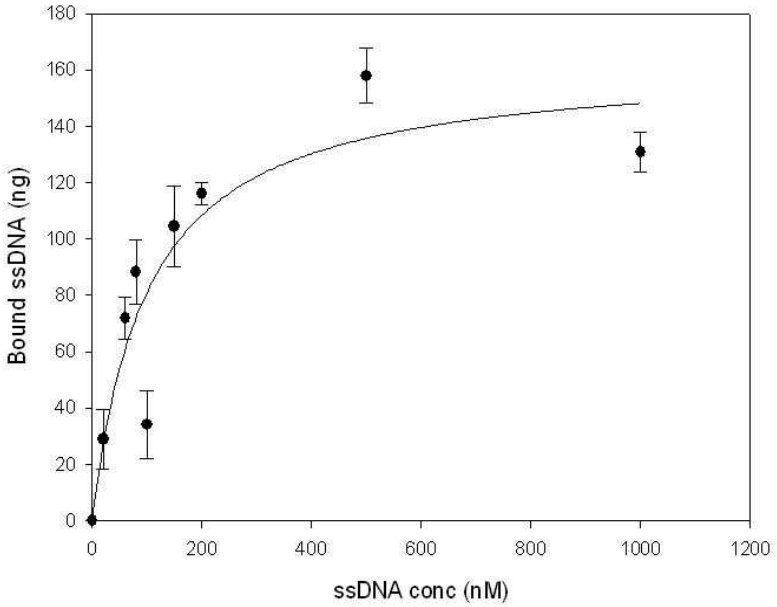
도면48


40
30
50
60
70
20
10
5'
3'

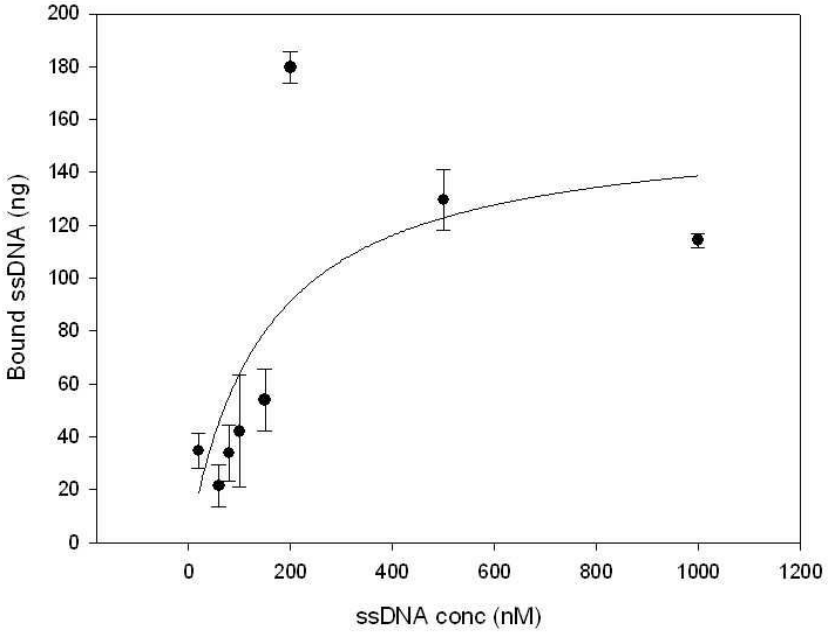
도면49


Bound ssDNA (ng)
ssDNA (uM)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
0
200
400
600
800
1000
1200

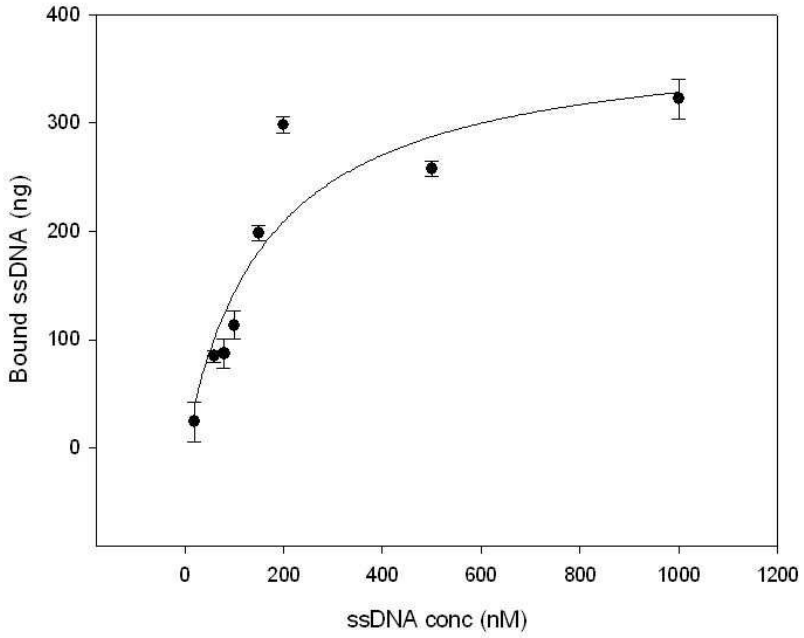
도면50


Bound ssDNA (ng)
ssDNA conc (nM)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
0
200
400
600
800
1000
1200

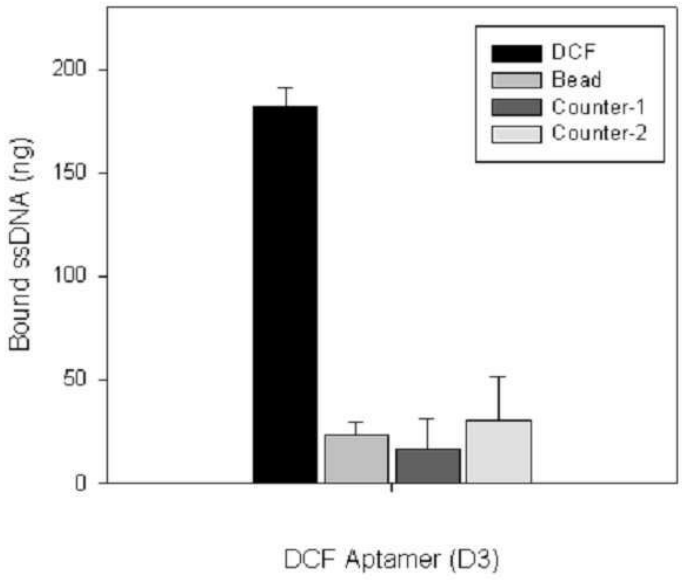
도면51


Bound ssDNA (ng)
ssDNA conc (nM)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
0
200
400
600
800
1000
1200

도면52



도면53



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> DNA aptamer binding to Diclofenac with specificity and production method thereof

<160> 45

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 1
ataccagctt attcaattgg agggaggtgt aggcgactgg ttaggcgcaa gaggctatag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 2
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 2
ataccagctt attcaattgc aacgtggcgg tcagtcagcg ggtggtgggt tcggtccaga 60

tagtaagtgc aatct 75

<210> 3
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 3
ataccagctt attcaattgg gcggacagca cgcagatcaa acgtcccata ccggtcctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 4
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 4
ataccagctt attcaattga cgggcgaggt cgactgcatc ccaatctgtg tgagtcctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 5
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 5
ataccagctt attcaattgg ccgcgactca ctgggtcggt ggatgtacta cgcgtctgag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 6
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 6
ataccagctt attcaattac acaccgagac cgcacttgta ctccctagcc gcctccgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 7
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 7
ataccagctt attcaattgg acaccgagac cgcacttgta ctcccgtcgc atgttgtgta 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 8
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 8
ataccagctt attcaattgg gcgggagagt cggtcaacac tgtgtgctag gtgtccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 9
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 9
ataccagctt attcaattgc ccggcaacag gttgtgacat gccagtgcga gaccgcccga 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 10
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 10
ataccagctt attcaattac acaccgagac cgcacttgta ctccctagcc gccctcccca 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 11
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 11
ataccagctt attcaattgg cagtaggtgt acatgcaaag ccagtgtggg tccctgtgta 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 12
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 12
ataccagctt attcaattgg gcacactaac gagacacacc tgaccacgcc tgcccgtcca 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 13
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 13
ataccagctt attcaattga caccatttgc ggcccatccc cgactgtgta gctgccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 14
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 14
ataccagctt attcaattgg cacgatgatc tgcattgtac gctataaccc atatgcccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 15
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 15
ataccagctt attcaattgc agcgaggtcc gacaccactc ctccgtccac ccttgtccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 16
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 16
ataccagctt attcaattac ccgcagacac ctcgatcgta tcacattgac ccccccgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 17
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 17
ataccagctt attcaattgg cgacggacct gtgatgtgtg tatggctcta ggggtgtaga 60

tagtaagtgc aatct 75

<210> 18
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 18
ataccagctt attcaattgg cgggggggatg tgtgtacgtg ccacgatcga cattgtgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 19
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 19
ataccagctt attcaattac acagttacag ccgggcttgg ccgataggta gcctctccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 20
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 20
ataccagctt attcaattgg ccacacacag actatggtgc tactcccccc atccccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 21
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 21
ataccagctt attcaattgg caacgatccg tctggctgtc ggctattgtg tccttcccca 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 22
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 22
ataccagctt attcaattgt gtcggcaatg cgggttgttg tcggttcgtc gtcgctccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 23
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 23
ataccagctt attcaattac ggaccctcgt gtgcggccag caccattatc cctgcgctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 24
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 24
ataccagctt attcaattcg acgtgtggtg tgtcccctgc tggatctgct gccgtgccca 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 25
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 25
ataccagctt attcaattgg caacataccc ggcaccctga ctccattcgg gcttgtgcag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 26
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 26
ataccagctt attcaattgg cagttgtcct tagccgatgt attgctcctg ccctgtccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 27
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 27
ataccagctt attcaattgc acaggtacaa tgtatgccca tgacacgatg acccccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 28
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 28
ataccagctt attcaattcg ttcgtgatac ggactgtttc agcccacgac cttcccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 29
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 29
ataccagctt attcaattgg gtactacaga ctgccgccgt agtcgatatc ttcgccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 30
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 30
ataccagctt attcaattga gacgttcagt cggaccactc tcatcccgcg tgtaccgtca 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 31
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 31
ataccagctt attcaattgg cggccaggac tagatgttcg cgtctactgc tgatgtcgag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 32
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 32
ataccagctt attcaattgg gcagtcatta tgatcccctc actgtgccct gtgctgccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 33
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 33
ataccagctt attcaattgg gtacgaagac atccccatca gccctcaact ccggtgctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 34
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 34
ataccagctt attcaattgg ggtaacatgg cgtgacctac tgcgcgagga gcctgtctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 35
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 35
ataccagctt attcaattgt acgtcggctt attgcataca tccccactgt agcccccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 36
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 36
ataccagctt attcaattgg ggacgatgga gagcgcaggc tggctactgg tgtggtgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 37
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 37
ataccagctt attcaattac acgcgatgac attgttgccg cccgaccctg ccgtgtgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 38
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 38
ataccagctt attcaattga ggagcatgta tccgagtggg atcaggtatt gacggcctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 39
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 39
ataccagctt attcaattgt gtcgtgtcac ctaccgatac atatgaactc gctaccccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 40
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 40
ataccagctt attcaattac acaccgagac cgcacttgta ctccctagcc gcctccgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 41
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 41
ataccagctt attcaattag taggtttgcc cgttcatgtc ccattacagc agctgccgag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 42
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 42
ataccagctt attcaattgg gcgaacttac gagacacacc tgaccacgcc tgcccgtcca 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 43
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 43
ataccagctt attcaattac acaccgagac cgcacttata ctccctagcc gcctccgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 44
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 44
ataccagctt attcaattgg gaaggacgac agtaggttcc agggtcaggc gcattgttag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 45
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer binding to diclofenac

<400> 45
ataccagctt attcaattag gatgccgatg agtgctagtg tgctatgact acgcgcccag 60

atagtaagtg caatct 76