



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0060213
(43) 공개일자 2010년06월07일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0118722

(22) 출원일자 2008년11월27일

심사청구일자 2008년11월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

구만복

서울시 동대문구 이문2동 426 삼성래미안 아파트
101동 302호

박지웅

서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 544호

이수진

인천 부평구 부평2동 767-293 늘봄마을 빌라 2동
301호

(74) 대리인

이문섭

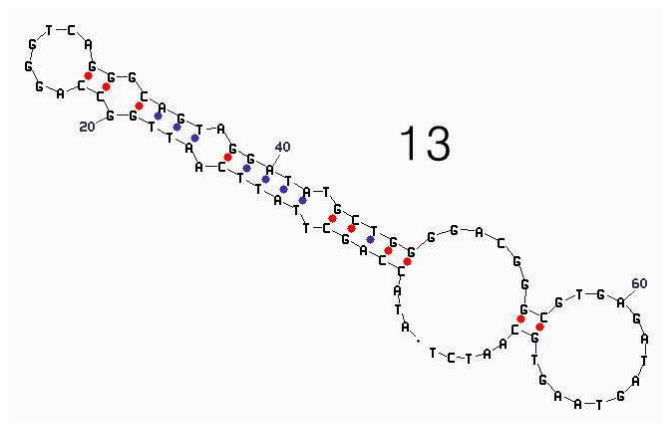
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선택된 비스파틴(visfatin)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 랜덤 DNA pool로부터 제 2형 당뇨병의 바이오마커인 비스파틴에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 DNA 앵타머를 SELEX process의 변형된 방법인 FluMag-SELEX process를 이용하여 선별하고, 선별된 DNA 앵타머들의 염기서열, 특성 및 비스파틴에 대한 결합력을 분석하였다. 따라서 본 발명의 DNA 앵타머를 이용하여 제 2형 당뇨병을 보다 효과적으로 진단할 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

비스파틴(visfatin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 DNA 앵타머는 서열번호 1 내지 36 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 DNA 앵타머.

청구항 3

하기 단계를 포함하는 비스파틴(visfatin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조방법:

- 비스파틴과 자성비드(magnetic beads)를 붕산염(borate) 버퍼용액에서 반응시켜 공유결합을 유도하는 단계;
- 양 끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30-50개의 임의의 염기를 가지는 DNA pool과 상기 공유결합으로 얻은 비스파틴-자성비드를 버퍼용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;
- 상기 비스파틴-자성비드에 결합된 DNA를 자석을 이용하여 분리하는 단계;
- 상기 분리된 비스파틴-자성비드로부터 DNA를 분리하는 단계; 및
- 상기 PCR용 프라이머 영역에 상보적인 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA를 증폭시키는 단계.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 a)단계의 공유결합은 비스파틴의 아미노기(amino group)와 자성비드의 토실기(tosyl group)의 공유결합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 a)단계 후, 공유결합된 비스파틴-자성비드에서 비스파틴과 결합하지 않은 자성비드의 토실기를 BSA(Bovine Serum Albumin) 용액으로 35-40℃에서 3-5시간 동안 불활성화 시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

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

청구항 7

제 3항에 있어서, 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 하는 방법.

청구항 8

비스파틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 제 2형 당뇨병 진단용 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 DNA 앵타머는 제 1항의 DNA 앵타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 제 2형 당뇨병은 제 1항의 DNA 앵타머에 결합하는 혈중 비스파틴의 수준을 측정함으로써 진단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선택된 비스파틴(visfatin)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 에디포카인(adipokine)은 지방조직에서 분비되는 단백질로서 대사에 중요한 역할을 한다. 비스파틴(visfatin)은 최근 새로이 발견된 내장지방 유래 단백질로서 비만에 의해 발병되는 제 2형 당뇨병과 밀접한 관련이 있음이 보고되고 있다. 구체적으로, 비만의 경우 내장지방 내의 비스파틴 발현양이 증가됨이 보고되었고 비스파틴의 혈중 농도는 피하지방에 비해 내장지방의 양과 훨씬 더 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다. 또한 비만이 발현될수록 혈중 내 비스파틴 농도가 증가된다는 것이 확인되었고, 임상실험 결과 제 2형 당뇨병환자의 혈중 비스파틴 농도(31.9 ± 31.7 ng/ml)는 성별과 관계없이 일반 수치(15.8 ± 16.7 ng/ml)보다 2배가량 높은 것으로 나타났다.(Miao-Pei Chen, et al., The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 91(1):295-299) 또한 고지방 사료를 급여한 쥐의 내장지방에 비스파틴이 다량 발현되었고 혈중 농도 또한 일반 사료를 급여한 쥐보다 높은 결과를 보였다.(Atsunori Fukuhara, et al., Science(2005), 307, 4426-4430) 이러한 결과들은 혈중 비스파틴 농도의 증가가 비만에 의해 발병되는 제 2형 당뇨병과 밀접한 관련이 있음을 보여주는 것이며 비스파틴이 제 2형 당뇨병의 바이오마커로서 사용될 수 있음을 의미하는 것이기도 하다. 따라서 지방세포에서 유래된 비스파틴의 혈중 레벨을 측정함으로써 제 2형 당뇨를 빠르고 정확하게 진단할 수 있다.

[0003] 앵타머(aptamer)는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA의 구조체이다. 앵타머는 타겟에 대한 친화도가 높고 열 안정성이 우수하며 시험관내(in vitro)에서 합성이 가능하기 때문에 비용면에서도 기존의 센서 분야에서 이용되는 감지물질들보다도 우위에 있다. 또한 타겟물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자, 환경호르몬 또는 항생제와 같은 작은 유기화학 물질, 그리고 박테리아 등의 다양한 타겟에 대한 앵타머가 합성될 수 있다. 이렇게 타겟물질과 특이적으로 결합하는 앵타머의 특성으로 인해 최근 들어 앵타머를 신약개발, 약물전달 시스템, 그리고 바이오센서 등의 분야에 이용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0004] 기존 바이오센서 분야에서 이용되는 다양한 감지물질 중 민감도 면에서 우위에 있는 것이 항체를 이용한 타겟물질의 검출이다. 이는 검출하고자하는 타겟물질(항원)을 동물의 몸에 주입하여 생체의 면역시스템을 통해 만들어지는 항체를 확보한 후 정제 과정을 거치기 때문에 시간이 많이 들고 고비용이라는 점이 첫 번째 문제점이라 할 수 있다. 또한 타겟물질에 있어 제약이 거의 없는 앵타머에 비해 항원으로 사용할 수 있는 타겟물질이 제한적이어서 독성물질과 같은 저분자 화학물질들에 대한 항체의 제작에 어려움이 있다. 일반적으로 항체는 그 크기가

100K Da 이상인 매우 큰 단백질이기 때문에 전기화학 기반 등의 바이오센서로 응용 시에 신호 검출 부분에 있어 제약이 있고, 열 안정성이 DNA나 다른 화합물질에 비해 현저히 떨어지는 문제가 있다. 그러므로 기존의 혈중 바이오마커의 진단에 있어 항체를 이용한 기술은 비용과 시간 면에서 효율적이지 않고, 적용범위가 다양하지 않으며 바이오센서로 응용하는 데에 있어 제한적인 문제점들이 있다. 이러한 문제점들을 개선하기 위한 새로운 감지 물질로서 다양한 타겟물질에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 앵타머를 이용하는 연구가 많이 이루어지고 있다.

- [0005] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 제 2형 당뇨병의 바이오마커인 비스파틴에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 개발하였다. 또한 상기 비스파틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 조성물을 이용하여 제 2형 당뇨병을 효과적으로 진단할 수 있을 것으로 판단하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 제 2형 당뇨병의 바이오마커인 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 그 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 이용한 제 2형 당뇨병 진단용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- [0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 비스파틴(visfatin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 제공한다. 본 발명에서는 상기 비스파틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 SELEX process를 이용하여 타겟물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 선택하였다.
- [0009] 본 발명에 사용된 용어 ‘SELEX 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.
- [0010] 본 발명에 사용된 ‘FluMag-SELEX process’는 DNA 증폭단계에서 형광 표지된 프라이머를 사용함으로써 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 이용하였는데, 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).
- [0011] 본 발명의 DNA 앵타머에서, 상기 DNA 앵타머는 비스파틴에 특이적으로 결합하는 어떠한 염기서열의 DNA 앵타머일 수 있으나, 바람직하게는 상기 FluMag-SELEX 방법에 의해 선택된 서열번호 1 내지 서열번호 36 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 비스파틴(visfatin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조방법을 제공한다:
- [0013] a) 비스파틴과 자성비드(magnetic beads)를 붕산염(borate) 버퍼용액에서 반응시켜 공유결합을 유도하는 단계;
- [0014] b) 양 끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30-50개의 임의의 염기를 가지는 DNA pool과 상기 공유결합으로 얻은 비스파틴-자성비드를 버퍼용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;
- [0015] c) 상기 비스파틴-자성비드에 결합된 DNA를 자석을 이용하여 분리하는 단계;
- [0016] d) 상기 분리된 비스파틴-자성비드로부터 DNA를 분리하는 단계; 및

- [0017] e) 상기 PCR용 프라이머 영역에 상보적인 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA를 증폭시키는 단계.
- [0018] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계의 공유결합은 비스파틴의 아미노기(amino group)와 자성비드의 토실기(tosyl group)의 공유결합인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계 후, 공유결합된 비스파틴-자성비드에서 비스파틴과 결합하지 않은 자성비드의 토실기를 BSA(Bovine Serum Albumin) 용액으로 35-40℃에서 3-5시간 동안 불활성화 시키는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 상기 a)단계 후, 활성을 가지고 있는 토실기가 남아있으면 분자간의 여러 상호작용, 예컨대 반데르발스 결합, 소수성 결합 등으로 인한 비특이적 결합이 일어날 수 있기 때문에, 활성이 거의 없다고 알려진 BSA로 활성을 가진 토실기를 블로킹시킨다.
- [0020] 본 발명의 방법에서, 상기 d)단계에서 DNA 분리는 70-90℃에서 3-10분간 두어 DNA를 비스파틴-자성비드로부터 분리시키는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 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 것이 바람직하다.
- [0022] 상기 전기영동에 사용된 폴리아크릴아마이드 겔에는 요소(urea)와 포름아마이드가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기게 되는데, 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 따라서 상기 플루오레세인이 붙어있는 DNA 밴드를 잘라내어 겔 추출(gel extraction)을 실시하고 다시 에탄올 침전법으로 분리하면 변성된 단일가닥 DNA를 확보할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 비스파틴(visfatin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 제 2형 당뇨병 진단용 조성물을 제공한다. 상기 DNA 앵타머는 바람직하게는 서열번호 1 내지 36 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물에서, 상기 제 2형 당뇨병은 상기 DNA 앵타머에 결합하는 혈중 비스파틴의 수준을 측정함으로써 진단하는 것을 특징으로 한다. 제 2형 당뇨의 중요한 바이오마커인 비스파틴의 혈중농도를 정확하게 측정하는 것은 제 2형 당뇨를 진단하는데 매우 중요하다. 따라서 혈액 샘플안의 여러 생체 물질 중에서 비특이적이며 적은 양의 비스파틴에도 특이적으로 결합할 수 있는 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 조성물을 이용하여 보다 신속하고 정확하게 2형 당뇨를 진단하는 데에 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 DNA 앵타머를 칩(chip)상에 형광물질, 발색물질 또는 항체 등과 함께 spotting 시킨 후 혈액샘플을 반응시킴으로써 혈액 중에 포함된 미량의 비스파틴의 수준을 신속하게 측정할 수 있다. 또 다른 방법으로는 자성비드에 상기 DNA 앵타머를 고정화시켜 비스파틴을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-비스파틴 complex를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 complex로부터 다시 비스파틴을 분리함으로써 비스파틴만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다. 본 발명에 기술된 방법 이외에도 본 발명의 DNA 앵타머와 연결자로 연결된 센서를 이용하여 혈액 중의 비스파틴을 검출하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0025] 이하, 본 발명의 비스파틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조방법 및 특성 분석방법을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.
- [0026] 1) 자성비드에 비스파틴(visfatin) 고정
- [0027] 비스파틴의 아미노기(amino group)와 자성비드 표면의 토실시(tosyl group)는 공유결합을 형성하게 되는데, 이를 위해 비스파틴과 자성비드를 버퍼용액에 넣고 반응시킨다. 반응 후 비스파틴이 결합된 자성비드는 자석을 이용하여 분리가 가능하며 같은 버퍼용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않았거나 표면에 약하게 붙어있는 비스파틴을 제거한다.

[0028]

[0029]

2) 비스파틴 결합 특이적 DNA 앵타머 개발

[0030]

표적물질 특이적인 앵타머를 개발하기 위한 방법으로는 일반적으로 SELEX(Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) 방법이 널리 사용되고 있다. 본 발명에서는 일반적인 SELEX를 변형한 FluMag-SELEX process를 이용하여 비스파틴 결합 특이적인 DNA 앵타머를 개발하였다. 이를 위하여 먼저 양 끝의 PCR 증폭을 위한 프라이머 결합부위의 중간의 40개의 임의의 염기를 가진 76 mer의 DNA pool을 합성하였으며, 이 DNA pool을 비스파틴이 고정되어 있는 자성비드와 함께 버퍼용액에 넣고 혼합하여 반응시킨 후, 자석을 이용해 비스파틴과 결합하지 않은 DNA를 제거한다. 고온 처리를 하여 비스파틴과 결합한 DNA를 자성비드에서부터 분리시킨 다음 에탄올 침전법으로 용리된 DNA를 확보한다.

[0031]

비스파틴 결합 특이적인 DNA의 양을 증폭하기 위해 PCR을 수행하고 PCR 반응물을 정제한 후 고농도의 요소(urea)가 들어있는 폴리아크릴아마이드 겔로 전기영동을 하여 이중나선 DNA인 PCR 결과물을 두 개의 단일가닥 DNA로 분리한다. 원래의 단일가닥 DNA 밴드를 겔 추출(gel extraction)한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보한다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 비스파틴이 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 비스파틴과 반응시킨다. 이러한 일련의 과정을 반복하여 90% 이상이 비스파틴에 결합하는 DNA pool을 얻은 후 DNA pool을 TOPO 클로닝 키트를 이용하여 클로닝하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한다.

[0032]

3) 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 분석

[0033]

비스파틴에 특이적으로 결합하는 앵타머의 다른 단백질에 대한 친화성과 비스파틴의 농도에 따른 결합력의 크기를 비교하기 위한 방법으로 표면자기공명장치(SPR)를 이용하였다. 이것을 위하여 베어 골드 칩(bare gold chip)의 표면을 개질하여 각각의 DNA 앵타머를 칩 위에 고정시킨 후 그 위에 비스파틴을 농도별로 반응시키고, 그 결합력을 확인하였으며 특이성 분석을 위해 다른 에디포카인(비스파틴, 아디포넥틴)과 HSA(human serum albumin)에 대한 결합력도 분석한다.

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 비스파틴의 고정

[0036]

비스파틴(visfatin, Adipogen Inc.)과 자성비드(M-280 Tosylactivated magnetic beads, Dynal Biotech ASA, Norway)를 버퍼용액(0.1 M borate buffer, pH 9.5)에 넣고 상온에서 48시간 반응시켰다. 비스파틴이 결합된 자성비드는 자석을 이용해서 분리가 가능하며, 동일한 버퍼용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않은 비스파틴을 제거하였다. 비스파틴이 결합된 자성비드(이하 '비스파틴-자성비드')는 세척 후 0.1 %의 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma Co.) 용액으로 37℃에서 4시간 반응시켜 비스파틴과 결합하지 않은 토실(tosyl)기를 불활성화시켰다. 이어 수차례 세척 후 버퍼용액(0.1 M PBS, pH 7.4)에 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 같은 방법으로 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA pool은 Genotech Inc.(Korea)에서 화학적으로 합성을 의뢰하였다.

[0039]

ATACCAGCTTATTCAATT-N40-AGATAGTAAGTGCAATCT

[0040] **실시예 3. 비스파틴과 결합한 DNA 앵타머의 선별**

[0041] 실시예 2에서 합성된 랜덤 DNA pool을 비스파틴이 고정되어 있는 자성비드(비스파틴-자성비드)와 함께 버퍼용액 (20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 0.02% Tween 20)에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 비스파틴과 결합하지 않은 DNA를 제거하기 위해 상기 혼합액이 들어있는 튜브를 자석에 고정시켜서 비스파틴과 결합하지 않은 DNA를 제거하고, 결합력이 약한 DNA를 제거하기 위해 버퍼용액으로 5회 세척하였다. 비스파틴과 결합한 DNA를 용리하기 위하여 튜브를 80℃에서 5분간 두어 DNA를 자성비드로부터 분리시킨 다음 에탄올 침전법으로 용리된 DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 비스파틴에 결합하는 DNA의 양을 측정하였다. 도 2에서, eluted ssDNA가 각각의 선별단계(selection round)에서 얻어진 비스파틴에 결합하는 DNA의 양을 보여준다.

[0042] **실시예 4. 비스파틴과 결합 가능한 DNA 앵타머 pool의 제조**

[0043] 비스파틴 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생산물은 이중가닥 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하는 과정을 위하여, 하기와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein, FP)을 고정하였다.

[0044] forward FP-fluorescein-ATACCAGCTTATTCAATT

[0045] reverse RP-AGATTGCACTTACTATCT

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

[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 비스파틴이 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 비스파틴과 반응시켰다. 이러한 과정의 모식도를 도 1에 나타내었고, 일련의 과정(FluMag-SELEX process)을 한 번의 선별(selection)이라 하면 총 7번의 선별과정을 거쳐 최종적으로 90% 이상이 비스파틴에 결합하는 DNA pool을 얻었다. 3번째와 7번째 선별 후에는 각각 HSA(human serum albumin, Sigma Co.), BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma Co.)와 다른 에디포카인인 아디포넥틴(adiponectin, Adipogen Inc.), 비스파틴(Retinol Binding Protein 4, Adipogen Inc.)로 counter selection을 실시함으로써 비특이적으로 결합하는 DNA를 차단하고 비스파틴에만 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA pool을 확보하였다. 도 2에서 각각의 선별(selection)에서 비스파틴이 고정된 자성비드로부터 용리된 ssDNA의 퍼센트를 제시하였다.

[0048] 최종적으로 얻어진 DNA pool을 TOPO 클로닝 키트(Invitrogen)를 이용하여 클로닝하고 얻어진 콜로니로부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한 결과, 비스파틴에 특이적으로 결합하는 서로 다른 36종의 핵산 구조체(DNA 앵타머)를 확보하였다.

[0049] **실시예 5. 비스파틴과 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 특성 분석**

[0050] 비스파틴에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 36종의 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1에 제시하였다. 또한 이 36종의 비스파틴 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 3 내지 도 38에 나타내었다.

[0051]

[표 1-1]. 비스파틴에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 36종의 DNA 앵타머 염기서열

서열번호	앵타머 (APT No.)	염기서열 (Sequence)
1	13	ATACCAGCTTATTCAATTGGCCAGGGTCAGGGCAGTAGGA TATGCTGGGGACGGGCGTGAGATAGTAAGTGCAATCT
2	47	ATACCAGCTTATTCAATTACGTAGTCAACGTTGATACTGC CACTCGTGATCTGCGGTAGATAGTAAGTGCAATCT
3	7	ATACCAGCTTATTCAATTACGGGCGGGTCGACGTACGATT GCGGGCTGGTGTGTGTCCAGATAGTAAGTGCAATCT
4	45	ATACCAGCTTATTCAATTGTAGGTGGCAACAGGCGGCCCG CTAATAGTATTGTATGTGCAGATAGTAAGTGCAATCT
5	33	ATACCAGCTTATTCAATTACGGGCGGGTCGACGTACGATT GCAGGCTGGTGTGTGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
6	38	ATACCAGCTTATTCAATTGGAGGCGGGTACGGTTCCGATG TATGGCTGGGGTCGTGTGAGATAGTAAGTGCAATCT
7	37	ATACCAGCTTATTCAATTACAGGCTGCCCCAATGTCCGT TTGTCATGCTCCAGTTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
8	43	ATACCAGCTTATTCAATTGGCAGCGATACGATGGCGGATA TAAGGTGGGGTGGGCGTGAGATAGTAAGTGCAATCT
9	17	ATACCAGCTTATTCAATTACGGGCGGGTCGACGTACGATT GCGGGCTGGTGTGTGTGAGATAGTAAGTGCAATCT
10	25	ATACCAGCTTATTCAATTACGGGCGGGTCGACGTACGATT GCGGGCTGGTGTGTGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
11	12	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCACGGCGAGTGAGCAATGG TTAGGGCTGGGCGTGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
12	4	ATACCAGCTTATTCAATTGACAGCGATACGGTGGCGGATA TAAGGTGGGGTGGGCGTGAGATAGTAAGTGCAATCT
13	19	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCAGGACAGGTGTCGGCTTG ATAGGCTGGGGTGTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
14	29	ATACCAGCTTATTCAATTAGTCGTGTGTGCTGATCGGTGG GCGCGGATACCCCTTGGTAGATAGTAAGTGCAATCT
15	34	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCGGGACAAGTGTGGCTT GATAGGCTGGGGTGTGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
16	49	ATACCAGCTTATTCAATTGCGGGGACGAACGACTGCACA TTGCATATGGTGGCGTCAAGATAGTAAGTGCAATCT
17	10	ATACCAGCTTATTCAATTGGCGTCATACAGTACCGACG ACGTTGTCACCGACTTATAGATAGTAAGTGCAATCT
18	28	ATACCAGCTTATTCAATTGGGGCGGGACAGGTGTCGGCTT GATAGGCTGGGGTGTGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
19	24	ATACCAGCTTATTCAATTGGGGCAGCGGCACAATGGCGGA AGGTGGGTATGGGTCGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT

[0052]

[0053] [표 1-2].

서열번호	앱타머 (APT No.)	염기서열 (Sequence)
20	6	ATACCAGCTTATTCAATTGGTTGTGTTATGCCACCCTACT GCATCACTATATCAGCCTAGATAGTAAGTGCAATCT
21	30	ATACCAGCTTATTCAATTGTGGTGCAACGGTCACATATCA CGACGGGTCCCGCAGCCTAGATAGTAAGTGCAATCT
22	15	ATACCAGCTTATTCAATTGGGCACGTTGCGGGGTCGATGA TATGCTGGGACGCGGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
23	35	ATACCAGCTTATTCAATTACACGCGATGACATTGTTGCCG CCCGACCCTGCCGTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
24	1	ATACCAGCTTATTCAATTACACACCGAGACCGCACTTGTA CTCCCTAGCCGCCTCCGTAGATAGTAAGTGCAATCT
25	31	ATACCAGCTTATTCAATTACATACCGAGACCGCACTTGTA CTCCCGTCGCATGTTATGTAGATAGTAAGTGCAATCT
26	50	ATACCAGCTTATTCAATTACTACACGTGTGTTAGGTCCAT ACAGCGGCGCGTCCATCGAGATAGTAAGTGCAATC
27	27	ATACCAGCTTATTCAATTGGGAGGGTGGCGGGTAGGTGGT GGTGGTGTGTGTGCCCAGATAGTAAGTGCAATCT
28	23	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTAAGGGGTCCGTCGT GGGGTAGTTGGGTGCGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
29	14	ATACCAGCTTATTCAATTGGGTACGTATGACCATCACAGC TCTATCCTACACCCCTCTAGATAGTAAGTGCAATCT
30	22	ATACCAGCTTATTCAATTACGGACGGCACACAGTGTACAG TCACCTGCATCGGCGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT
31	44	ATACCAGCTTATTCAATTATATGCGGCCCATCACCTACCA GCTGTGTTGTTTGCCCTAGATAGTAAGTGCAATCT
32	3	ATACCAGCTTATTCAATTCCTCGAGCGAAGTGTTGTTAT GTCCCTTTACCGCGATGTAGATAGTAAGTGCAATCT
33	11	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTGAGGGGTCCGTCGT GGGGTAGTTGGGTGCGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
34	20	ATACCAGCTTATTCAATTCGAGTACACGAGCCATGGATCA CACCCGTCTGTTTGGTTCGAGATAGTAAGTGCAATCT
35	41	ATACCAGCTTATTCAATTCCACGCGCCTATCCACCACAGA TCATCATTCCGTGCATGTAGATAGTAAGTGCAATCT
36	42	ATACCAGCTTATTCAATTGTACGATGACCAGGCCTTCCAC GCTCCATTCTATCCGTTGTAGATAGTAAGTGCAATCT

[0054]

[0055] 비스파틴에 강하게 결합하는 36종의 앱타머들이 다른 혈중 단백질에는 결합하지 않고 오직 비스파틴에만 특이적으로 결합한다는 것을 보여주는 실험을 실시하였다. 비스파틴은 원래 에디포카인 중의 하나이므로 비스파틴 앱타머가 비스파틴에만 특이적으로 결합하는 것을 보여주기 위한 가장 좋은 대조군으로서 또 다른 에디포카인인 아디포넥틴과 비스파틴, 그리고 HSA가 사용되었다.

[0056] 이를 위하여 자기공명장치인 SPR(Surface Plasmon Resonance) 장치를 이용하였다. 먼저 50 mM의 3,3'-dithiodipropionic acid로 금 칩(bare gold chip)의 표면에 카복실기(COOH group)를 만든 다음 EDC/NHS (N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide; EDC/Sigma Co. 및 N-hydroxysuccinimid; NHS/Fluka)를 이용하여 Self Assembly Monolayer를 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 각각의 앱타머를 1 μ M으로 코팅시켰다. 여기에 1 μ M의 비스파틴, 아디포넥틴, 비스파틴, HSA를 버퍼용액(20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 0.02% Tween 20)안에서 각각 30분간 반응시킨 후 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 단백질을 씻어내었다. 최종적으로 SPR 결과를 분석하여 비스파틴 앱타머가 다른 단백질들보다 비스파틴에 월등하게 잘 결합하는 것을 확인할 수 있다. 이에 대한 결과로서, 결합력이 가장 우수한 No. 19 앱타머의 결합력 실험 결과를 도 39에 제시하였다.

[0057]

[0058] 실시예 6. 비스파틴과 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 특이성 및 결합력 분석

- [0059] 비스파틴에 특이적으로 결합하는 서로 다른 36종의 앵타머 중에서 특이성 및 결합력이 가장 높은 No.19 앵타머에 대한 비스파틴과의 결합 분석(binding assay)을 실시하였다. 실시예 5에서와 동일한 방법으로, 금 칩에 100 nM로 앵타머를 고정시킨 후 25 nM부터 400 nM의 서로 다른 농도의 비스파틴을 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 0.02% Tween 20)에서 30분간 반응시켰다. 해리상수를 구하기 위해서 각각의 반응 정도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 Sigmaplot 10.0을 이용하여 plotting되었고, 여기에 $y=B_{max} \cdot X/K_d + X$ 식이 이용되었다(y는 포화도, B_{max}는 최대 결합 위치, K_d는 해리상수, X는 결합하지 않은 비스파틴).
- [0060] 그 결과로, No.19 앵타머의 K_d 값이 123.5 ± 28.9 nM로서 비스파틴과 매우 강력하게 결합하는 것이 확인되었고 이에 대한 분석 데이터를 도 40a 내지 도 40c에 제시하였다.

산업이용 가능성

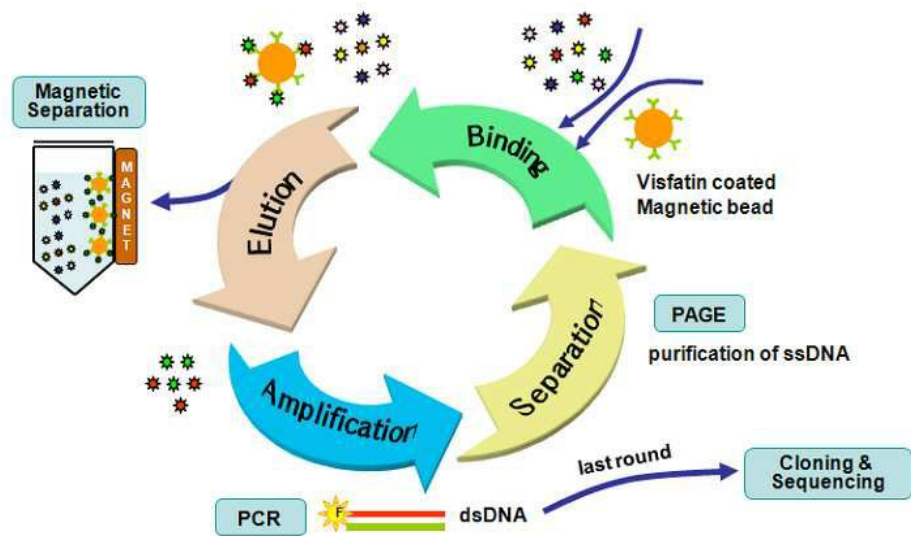
- [0061] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 비스파틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하면 기존에 사용되고 있는 항체 기반 분석보다 더 민감하고 정확하게 혈중 비스파틴의 농도를 측정할 수 있을 것으로 기대되며, 또한 상기 DNA 앵타머는 항체에 비해 생산비용이 적고 표면에 고정화하기가 쉬우므로 바이오센서 칩 제작에 유리하다. 따라서 이러한 비스파틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하여 혈중 비스파틴 농도를 민감하고 정확하게 측정할 수 있는 바이오센서 개발하면 2형 당뇨병의 진단의 정확성을 증가시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

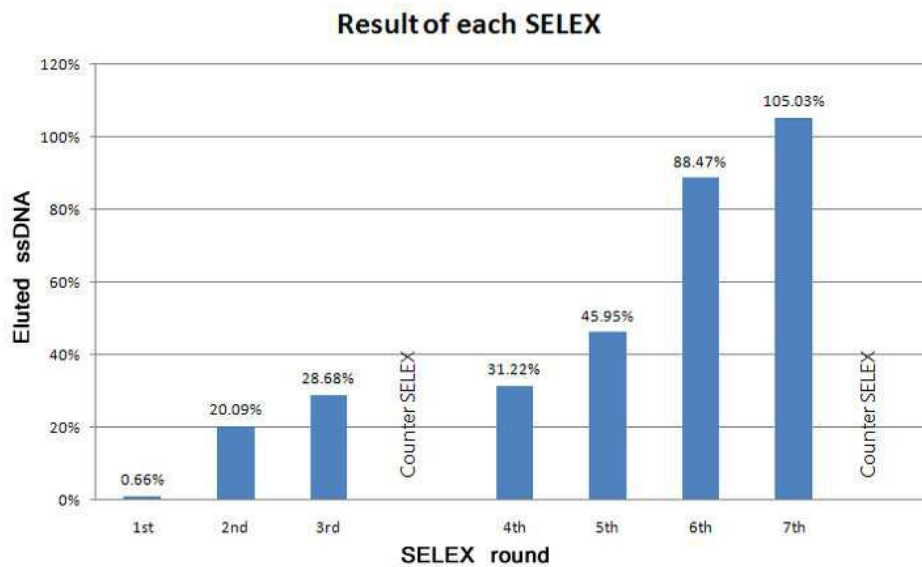
- [0062] 도 1은 본 발명에 따른 비스파틴에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체 앵타머의 개발을 위한 FluMag-SELEX process 모식도이다.
- [0063] 도 2는 본 발명에 따른 SELEX process 중 각 selection의 ssDNA pool에서 비스파틴에 결합하는 ssDNA의 비율 증가도이다.
- [0064] 도 3 내지 도 38은 본 발명에 따른 비스파틴에 특이적으로 결합하는 36종의 핵산 구조체 앵타머의 염기서열을 웹서버 기반의 m-fold 프로그램을 이용하여 분석한 DNA 앵타머 2차 구조 모식도이다.
- [0065] 도 39는 본 발명에 따른 비스파틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머인 No.19의 다른 에디포카인 및 HSA에 대한 특이성 분석 결과이다.
- [0066] 도 40은 본 발명에 따른 결합 특이성이 가장 큰 No.19 앵타머의 비스파틴과의 결합분석(binding assay) 결과이다.

도면

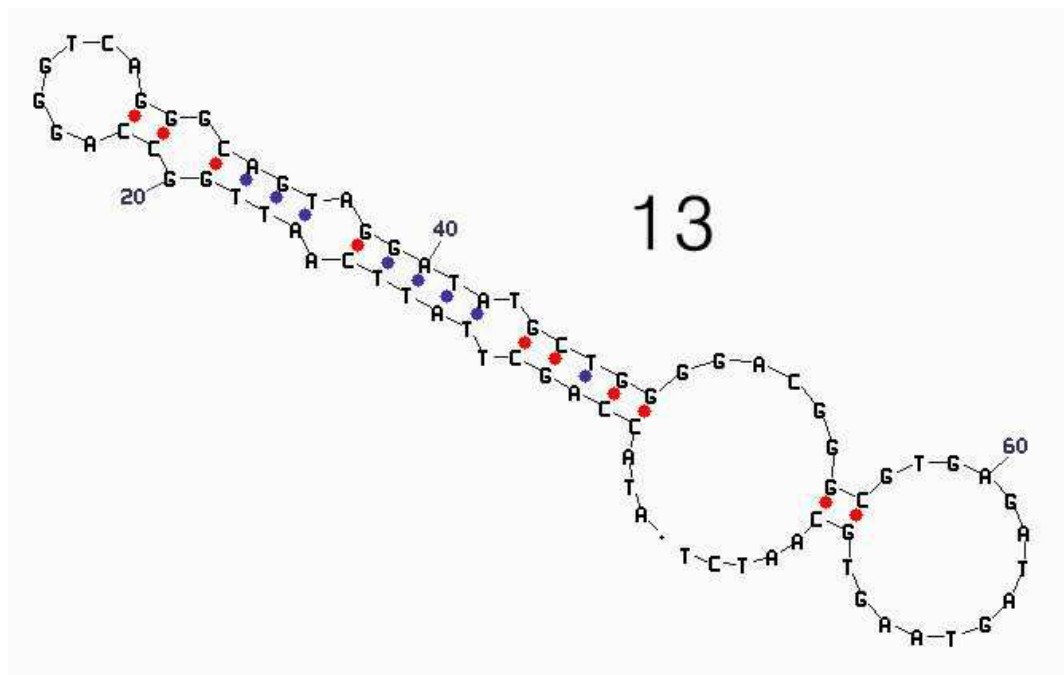
도면1



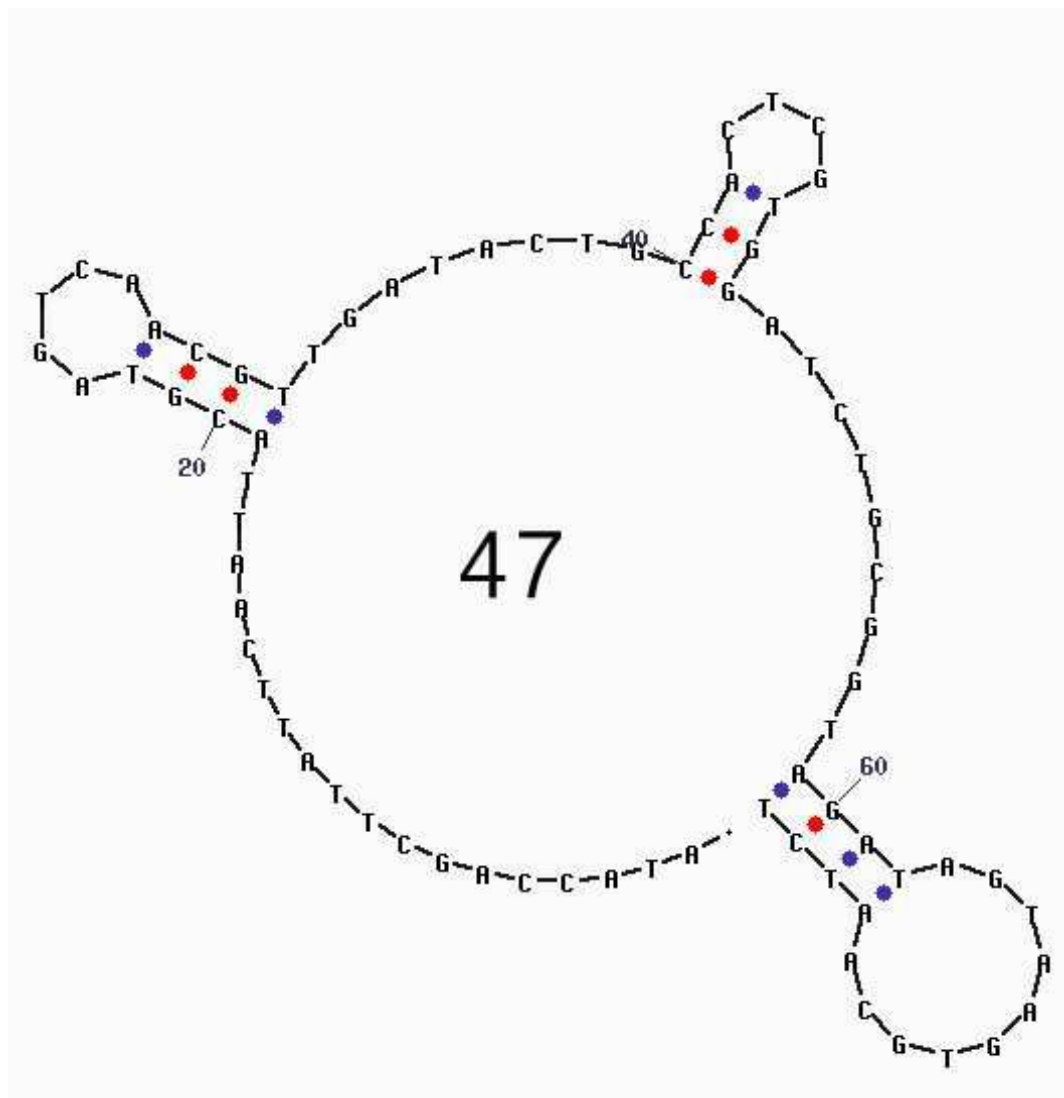
도면2



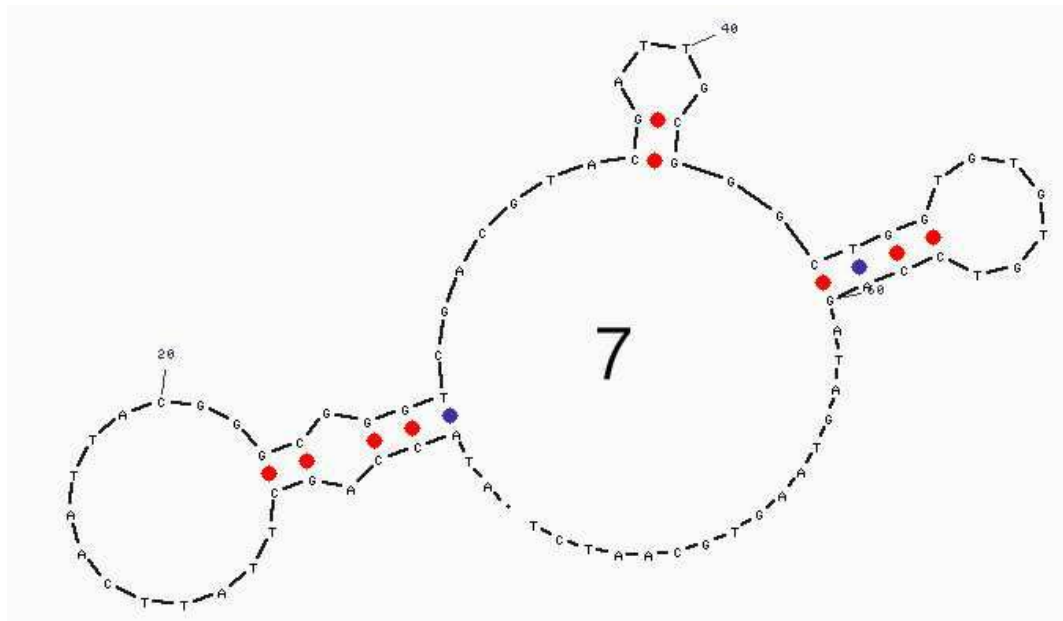
도면3



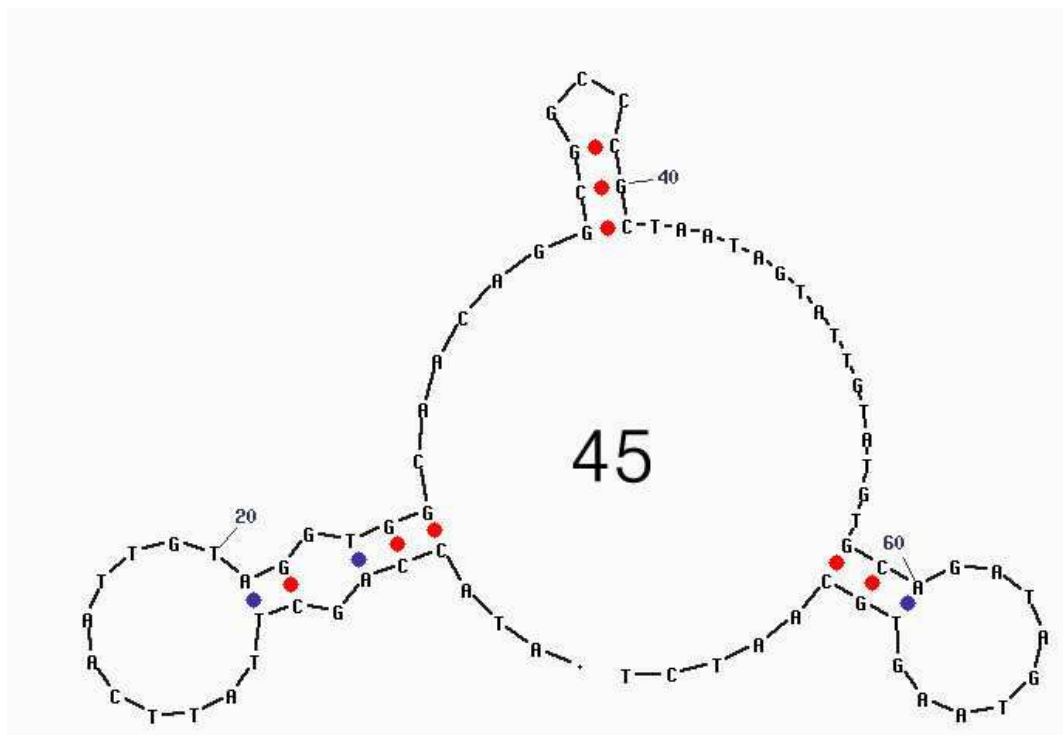
도면4



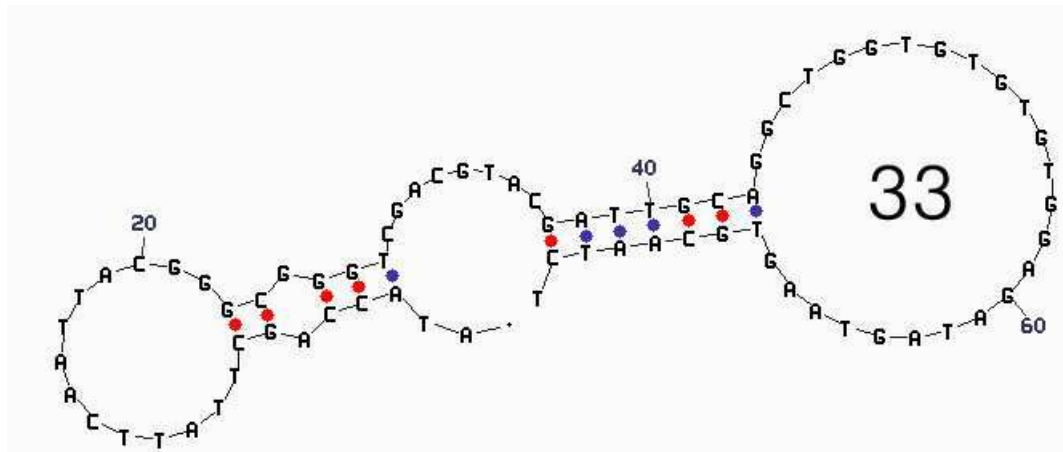
도면5



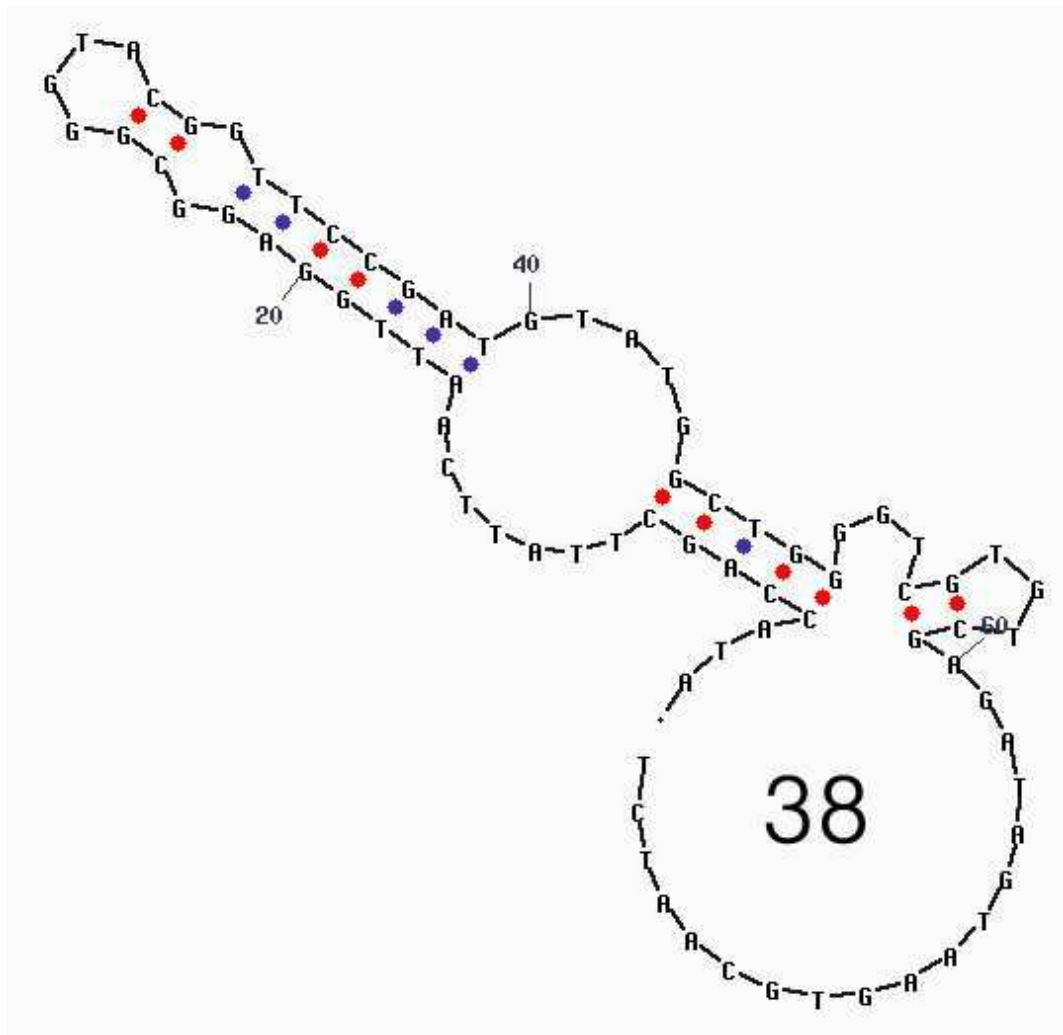
도면6



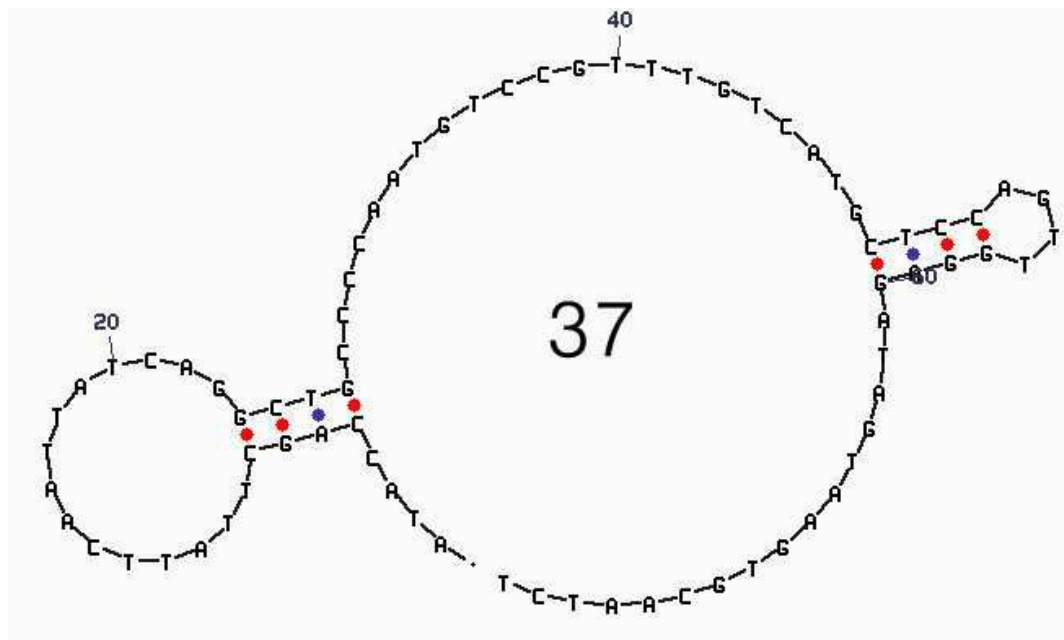
도면7



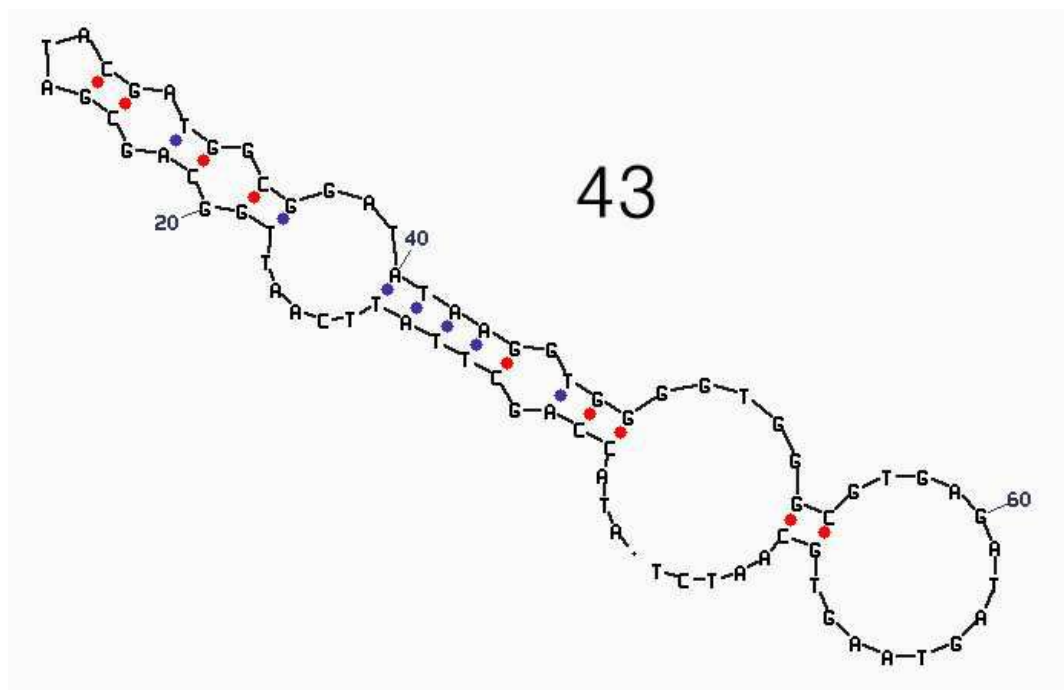
도면8



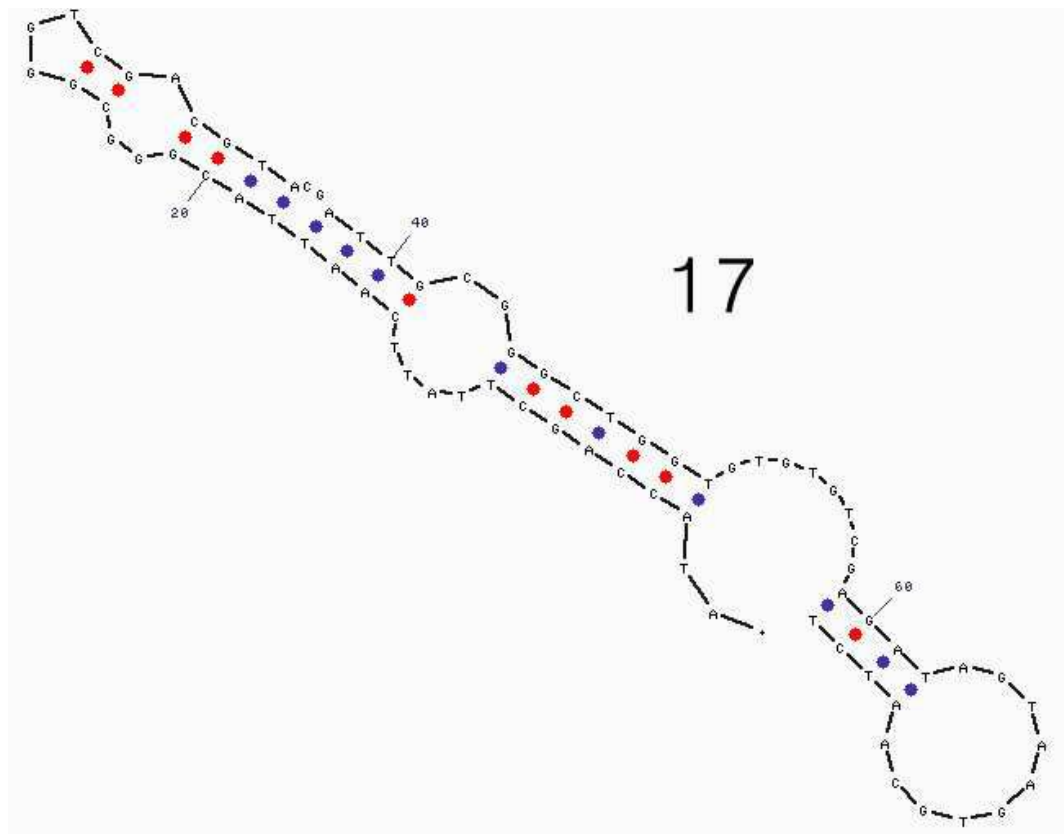
도면9



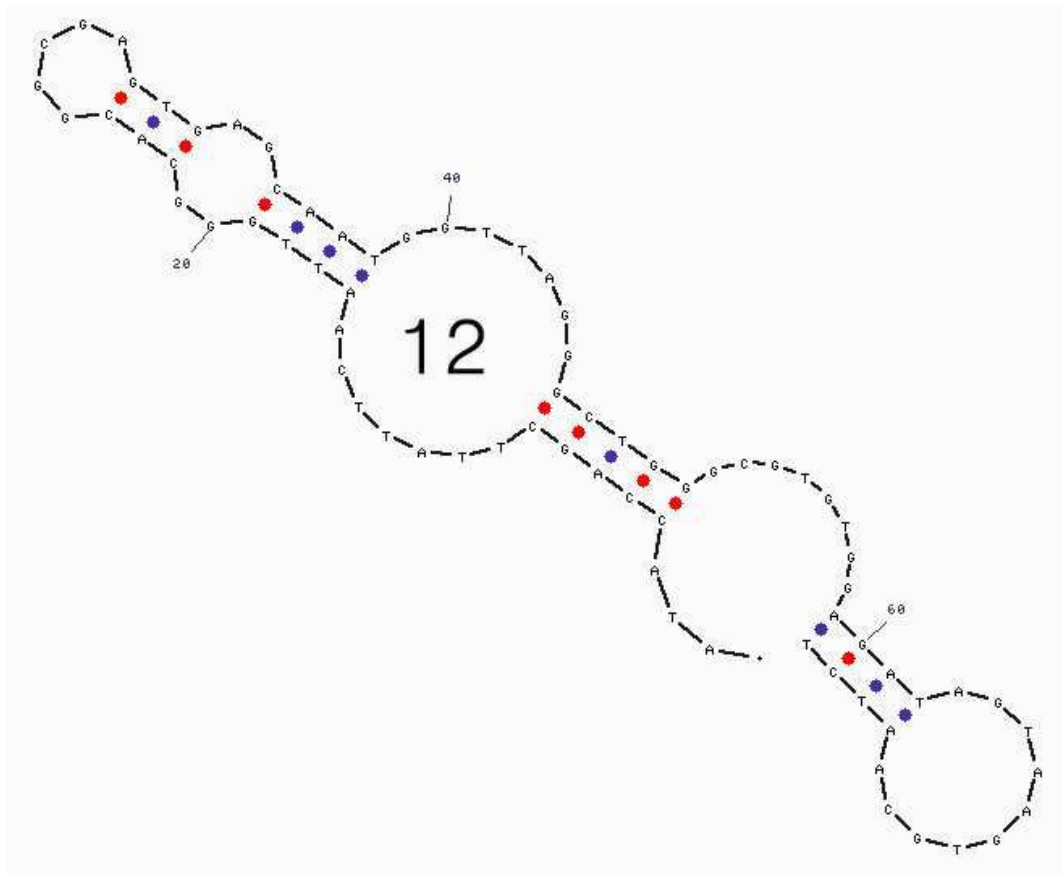
도면10



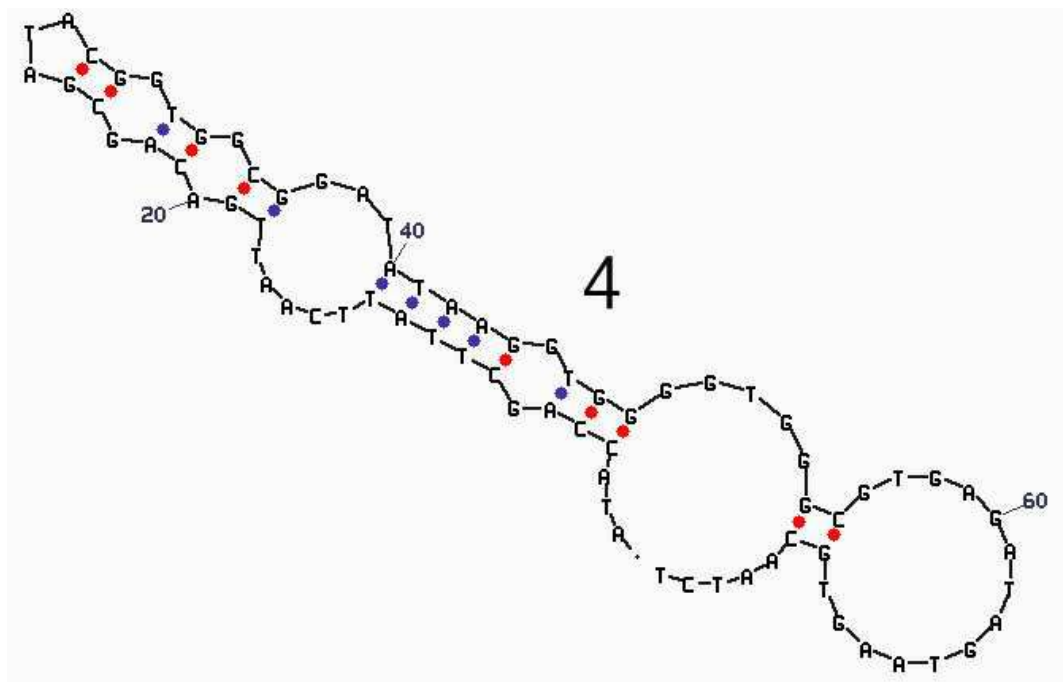
도면11



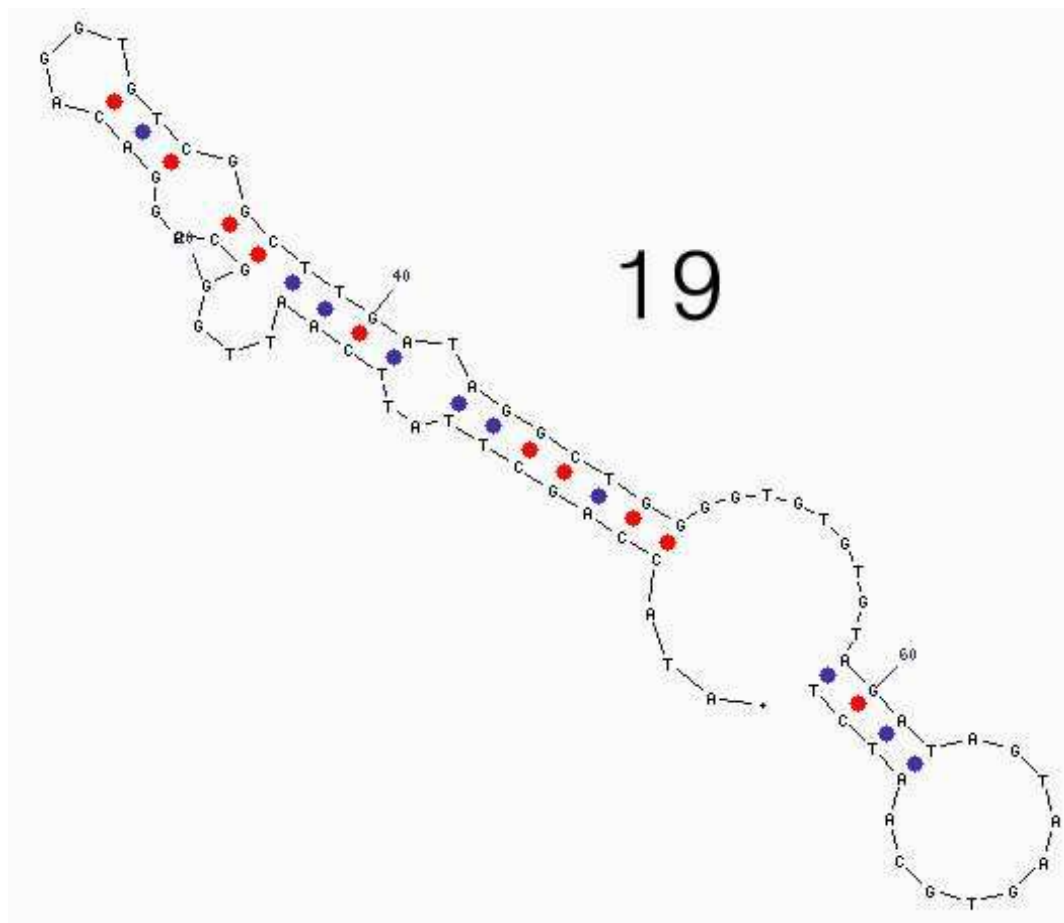
도면13



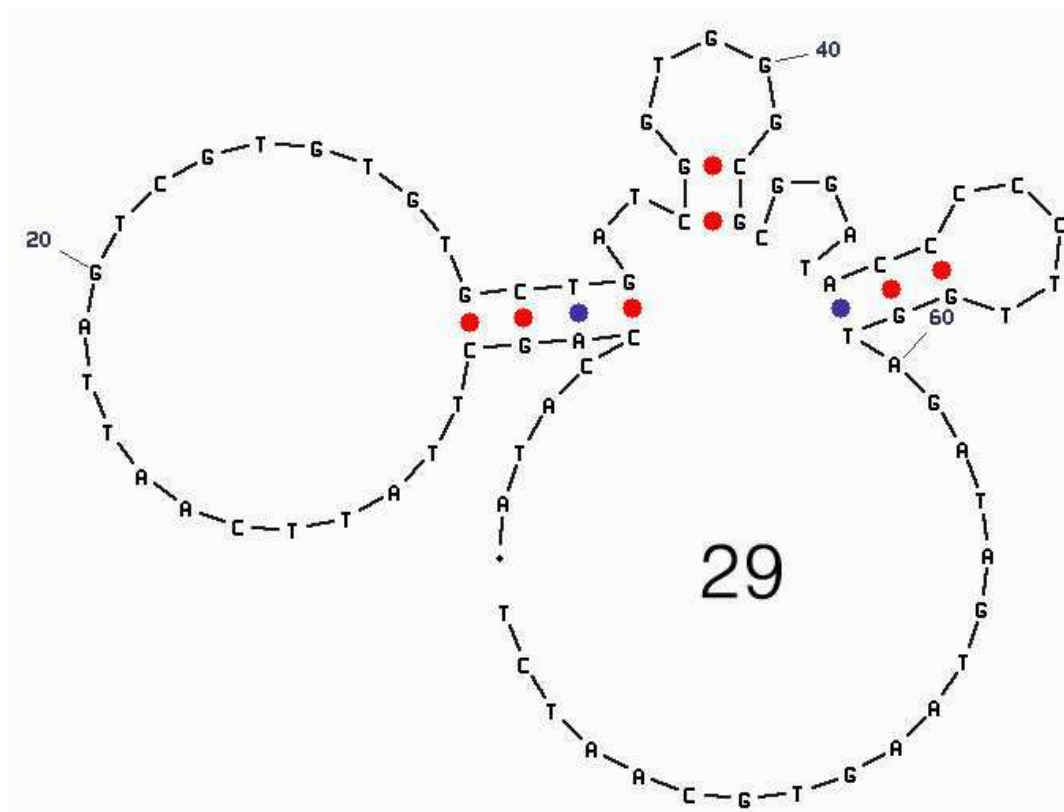
도면14



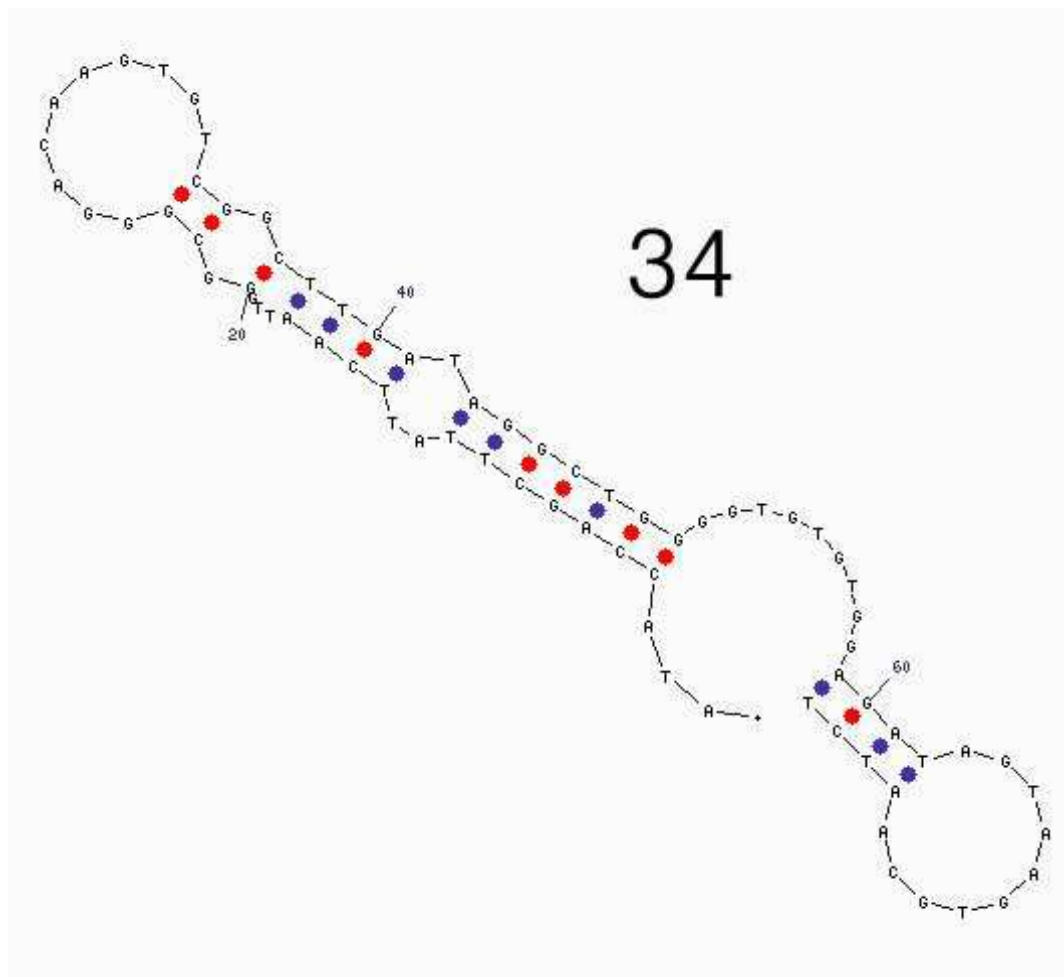
도면15



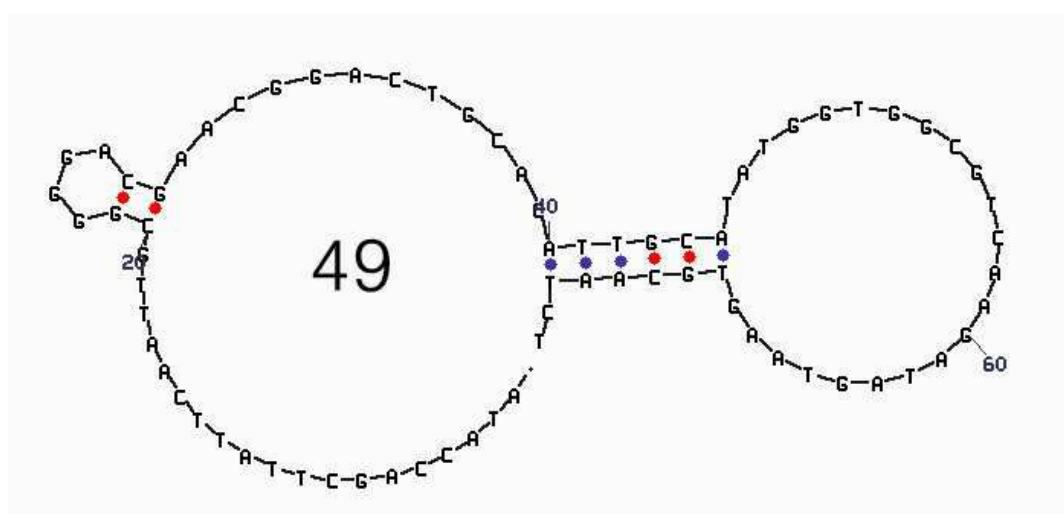
도면16



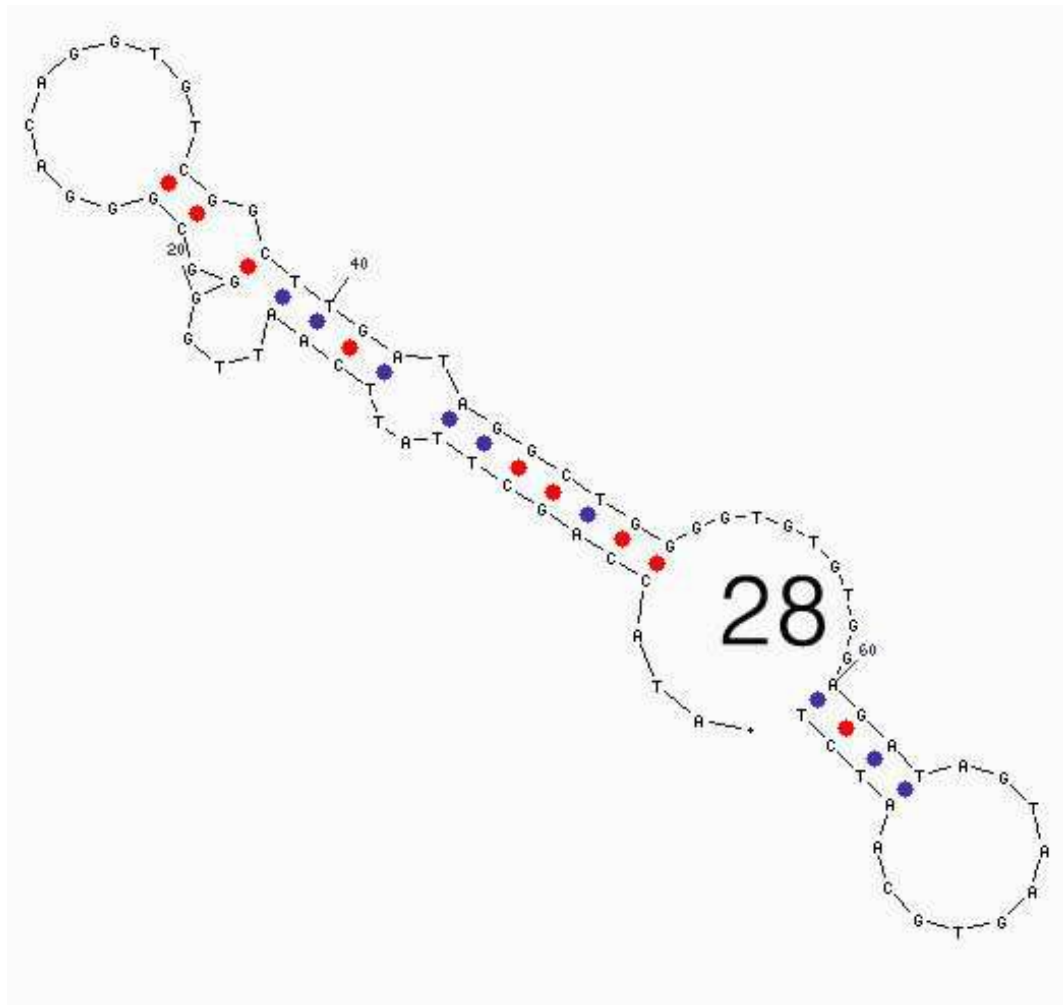
도면17



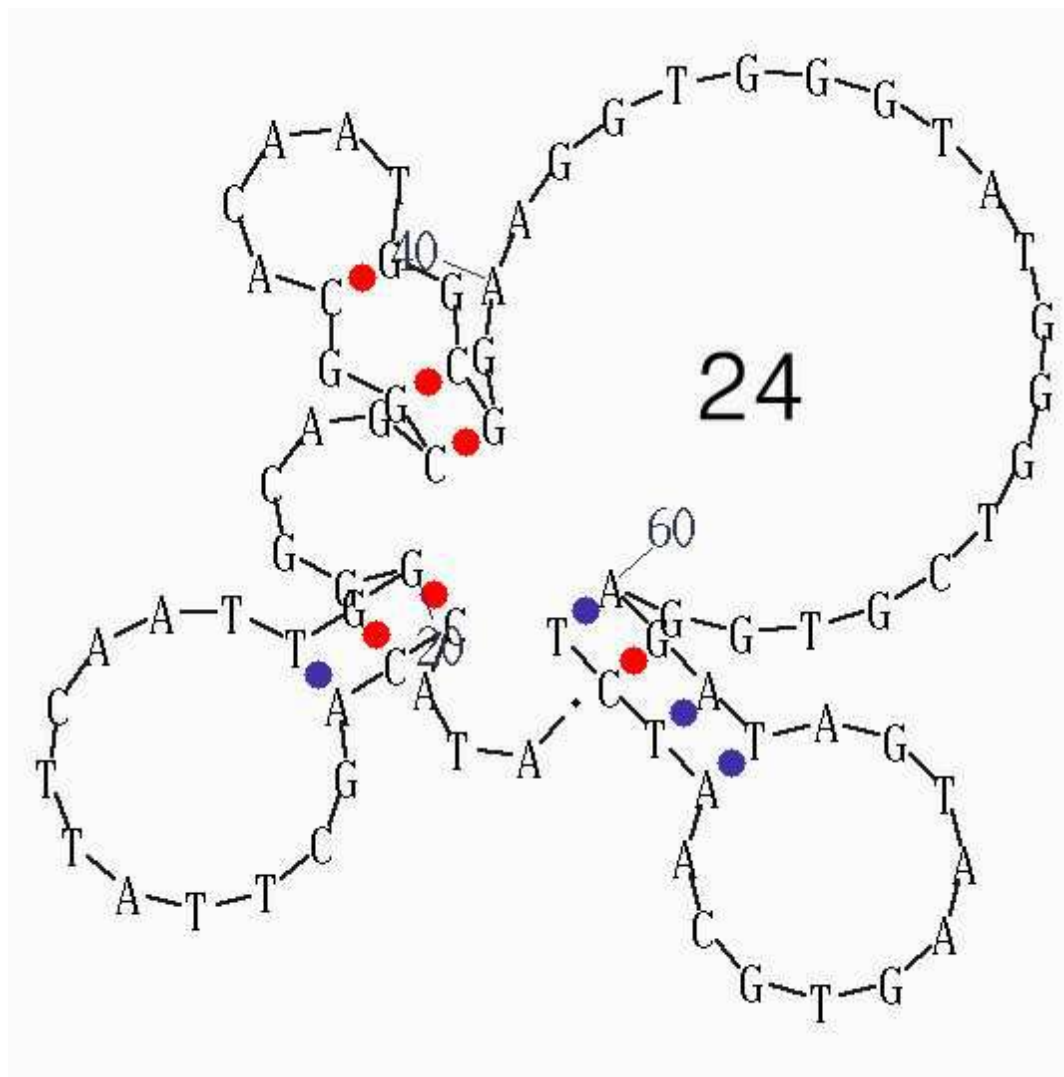
도면18



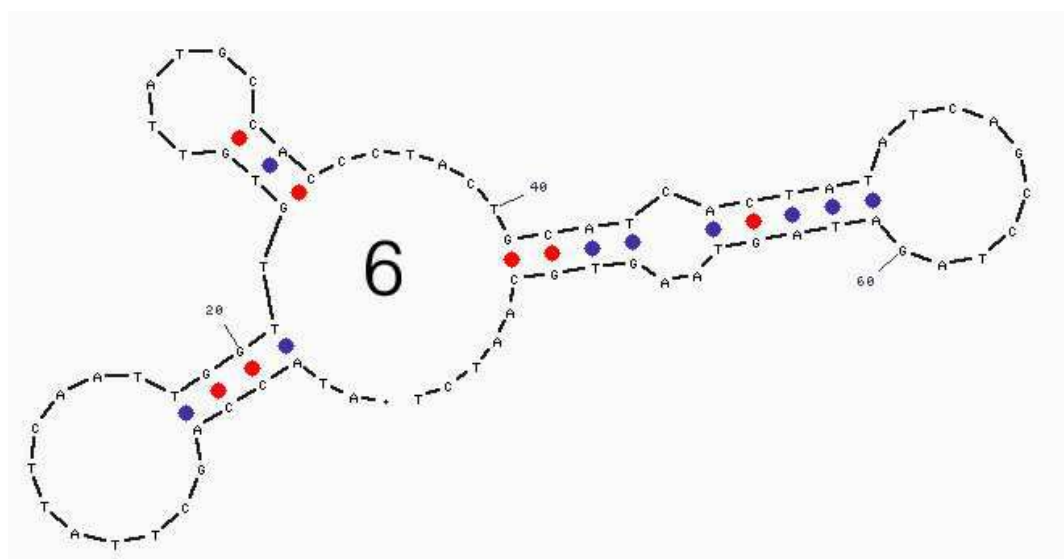
도면20



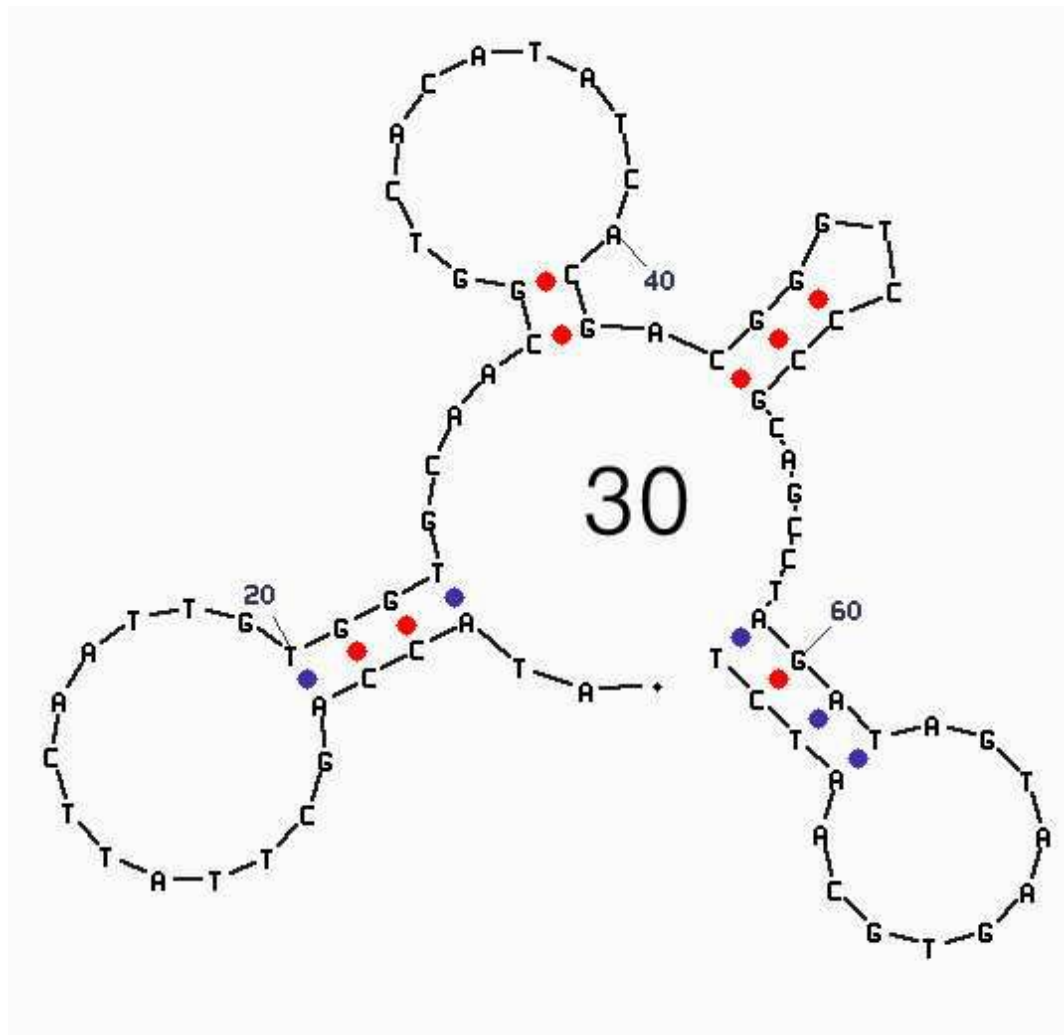
도면21



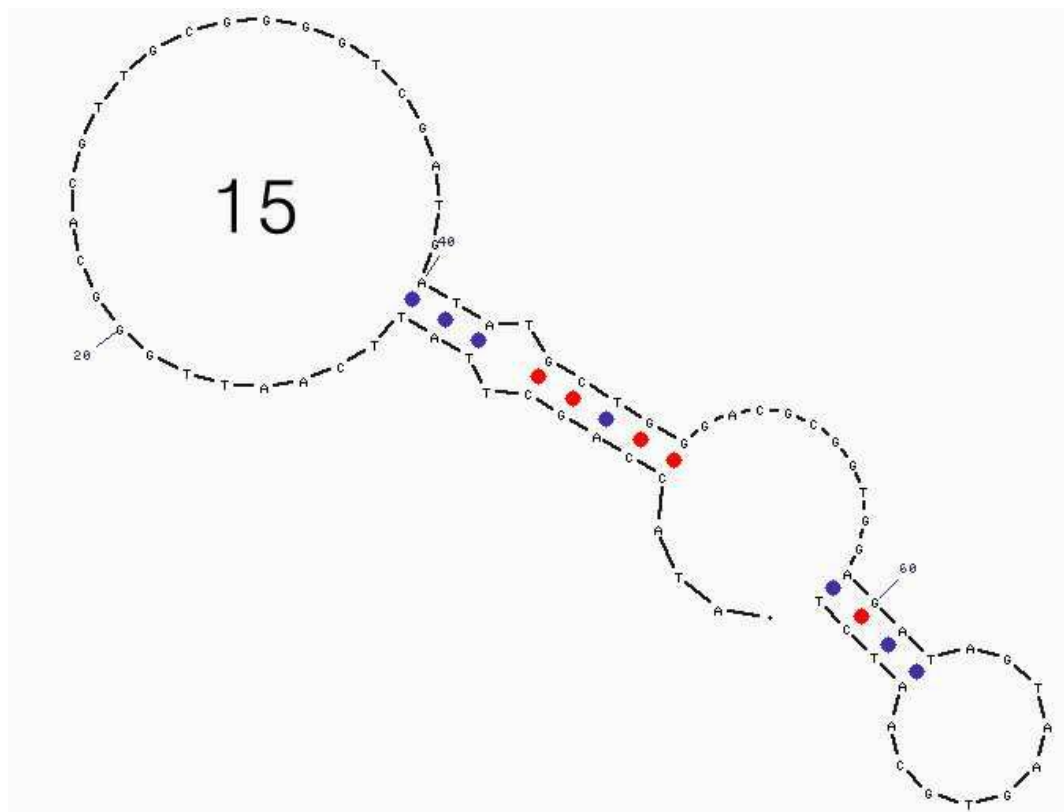
도면22



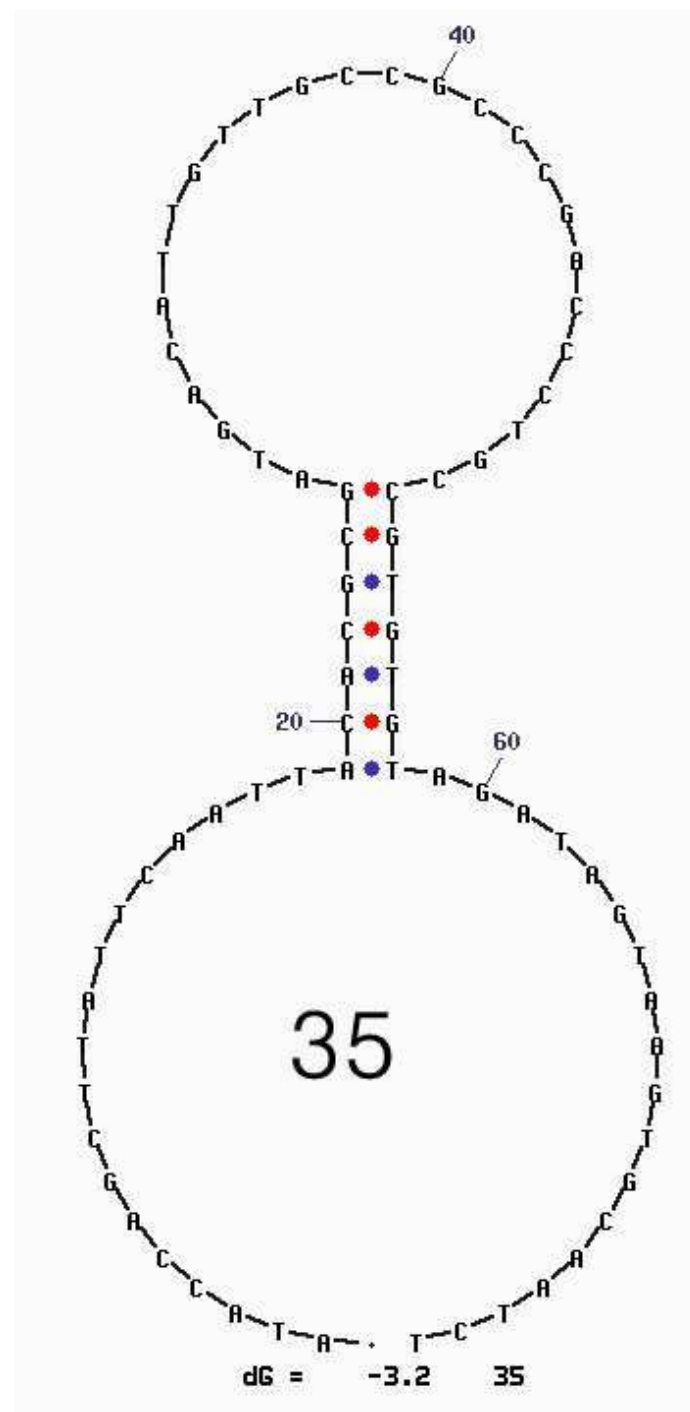
도면23



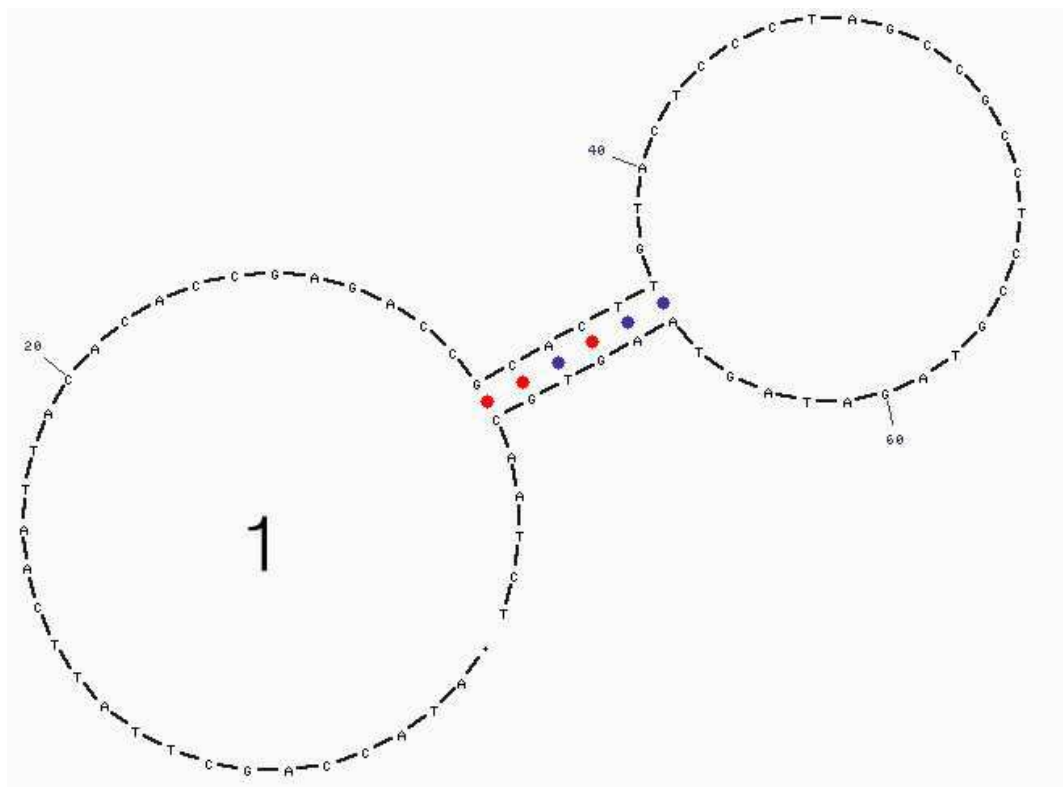
도면24



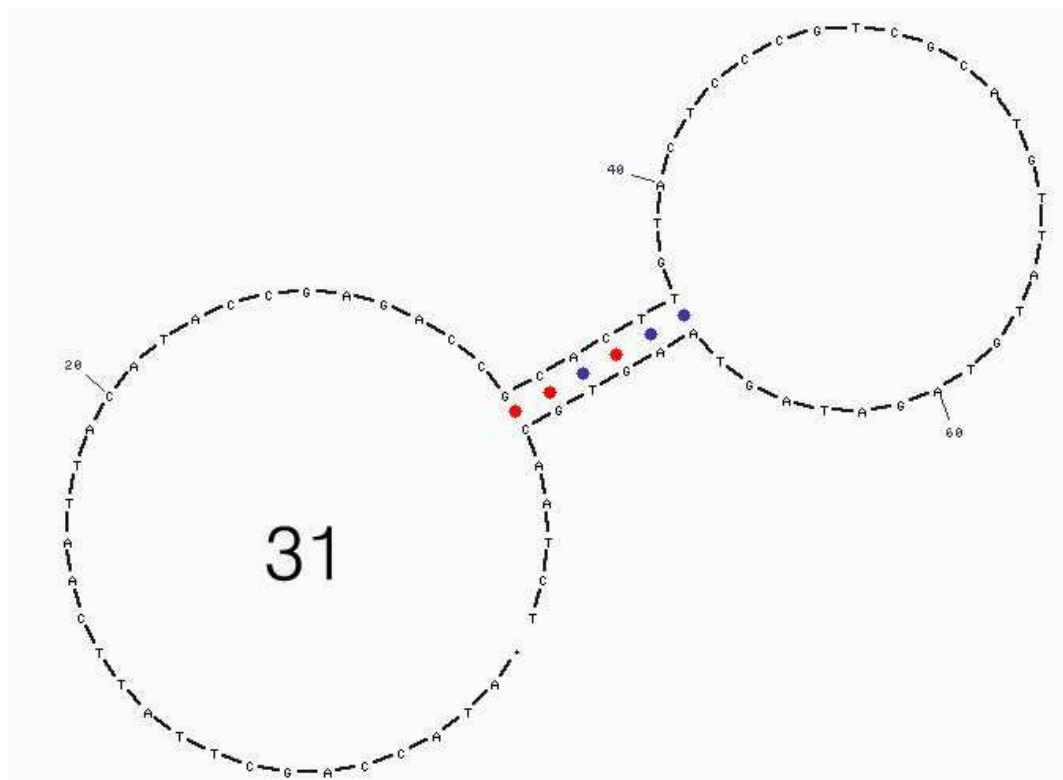
도면25



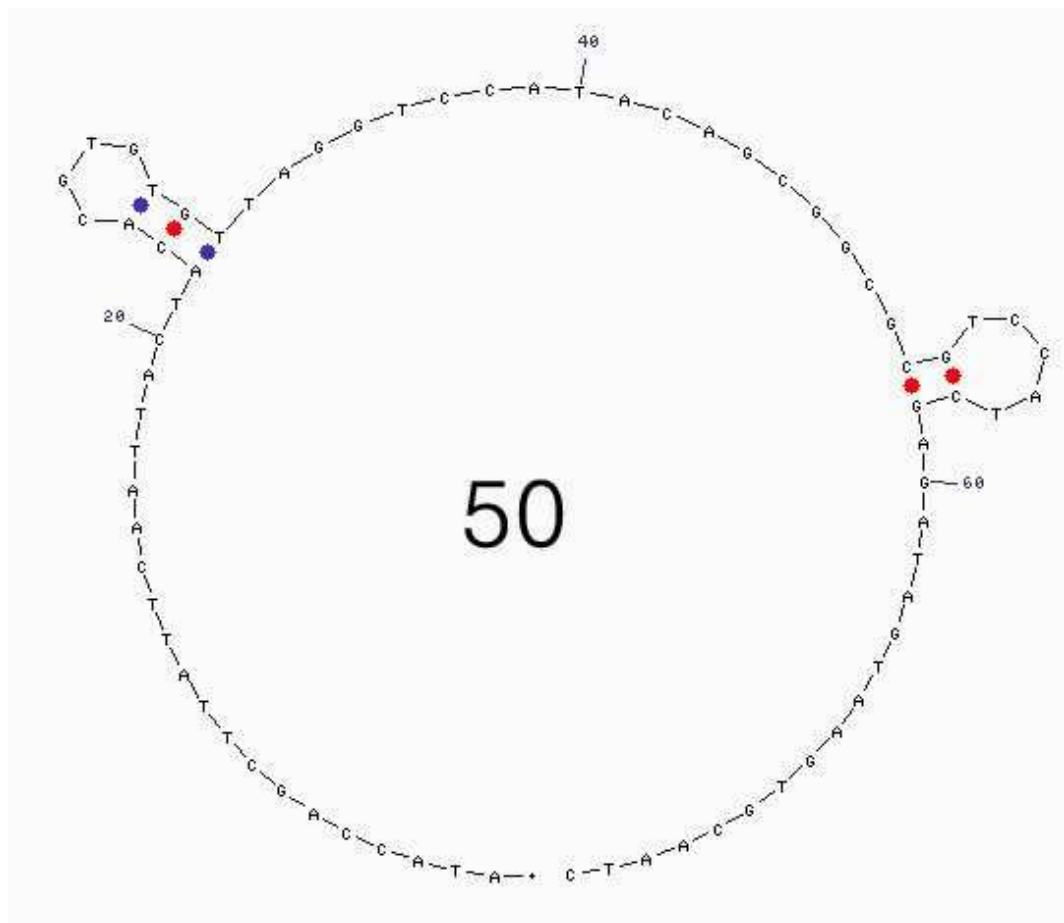
도면26



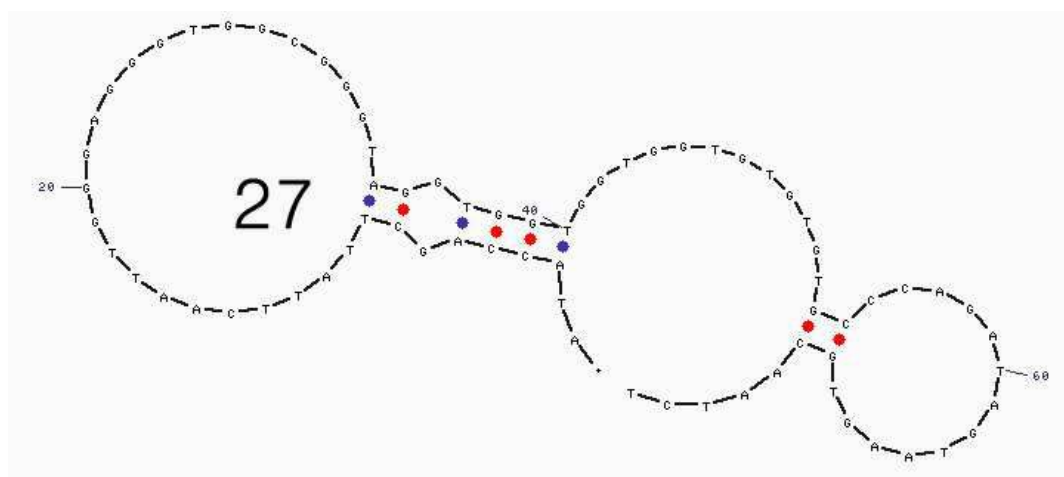
도면27



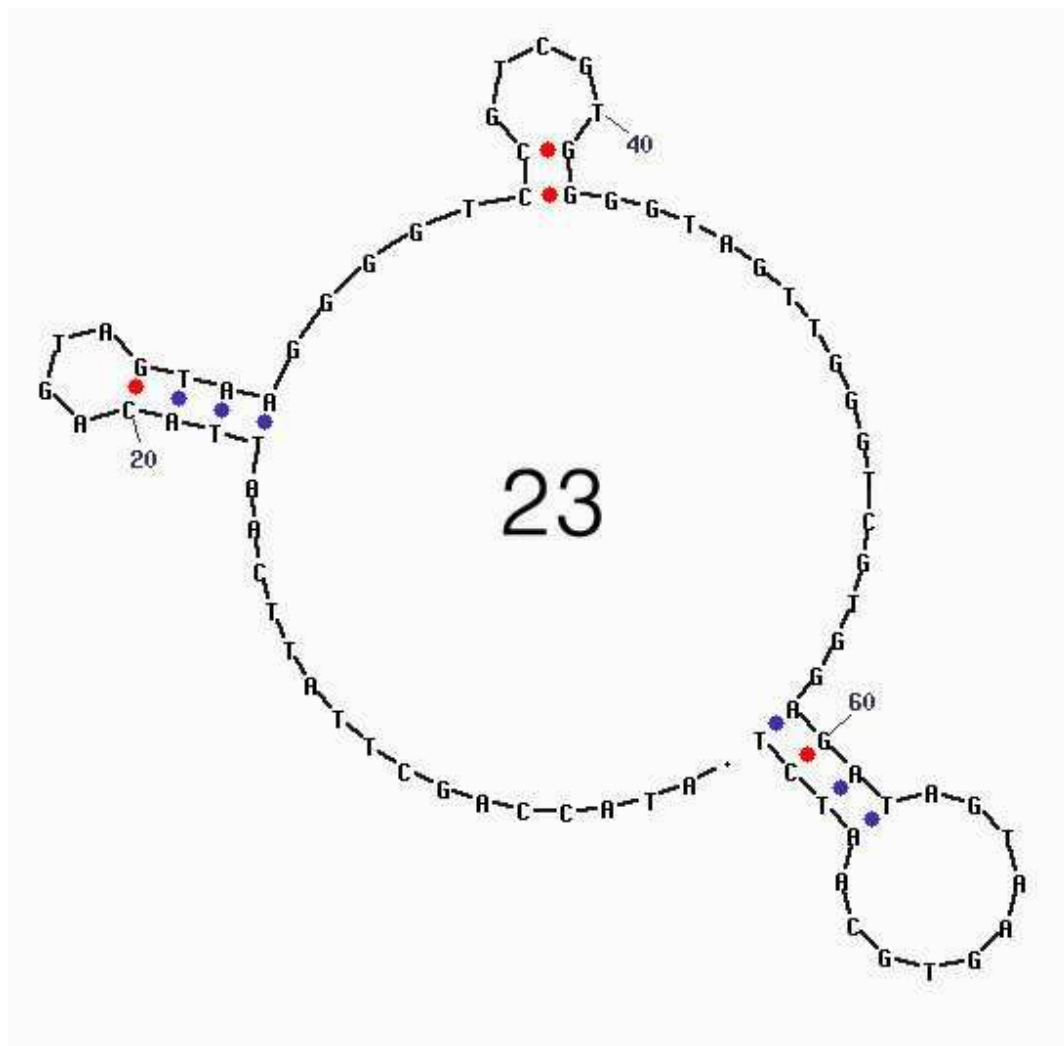
도면28



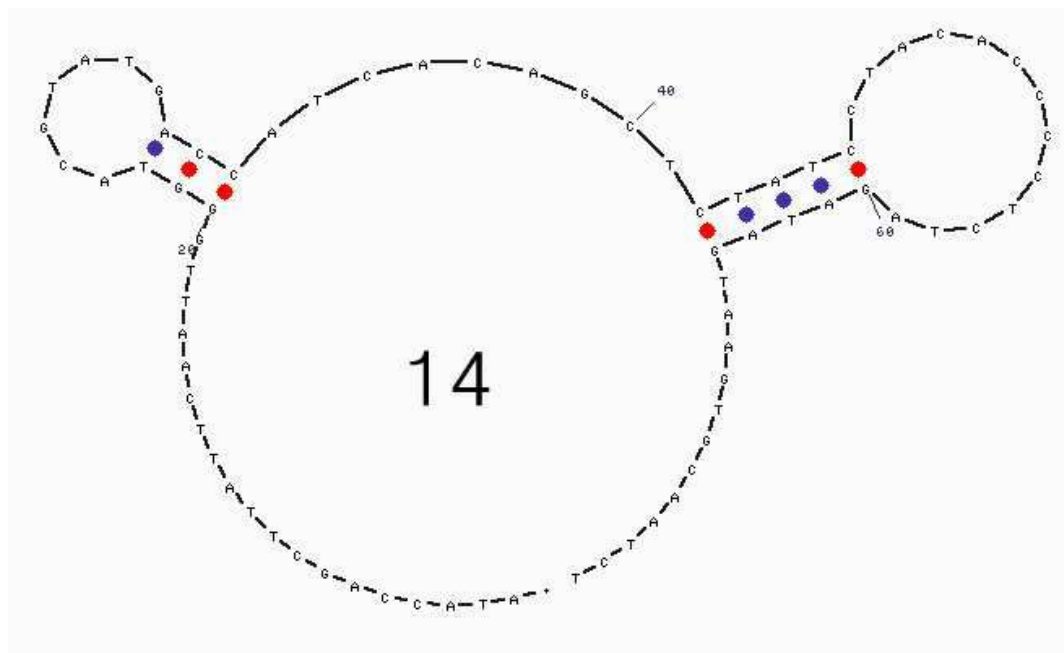
도면29



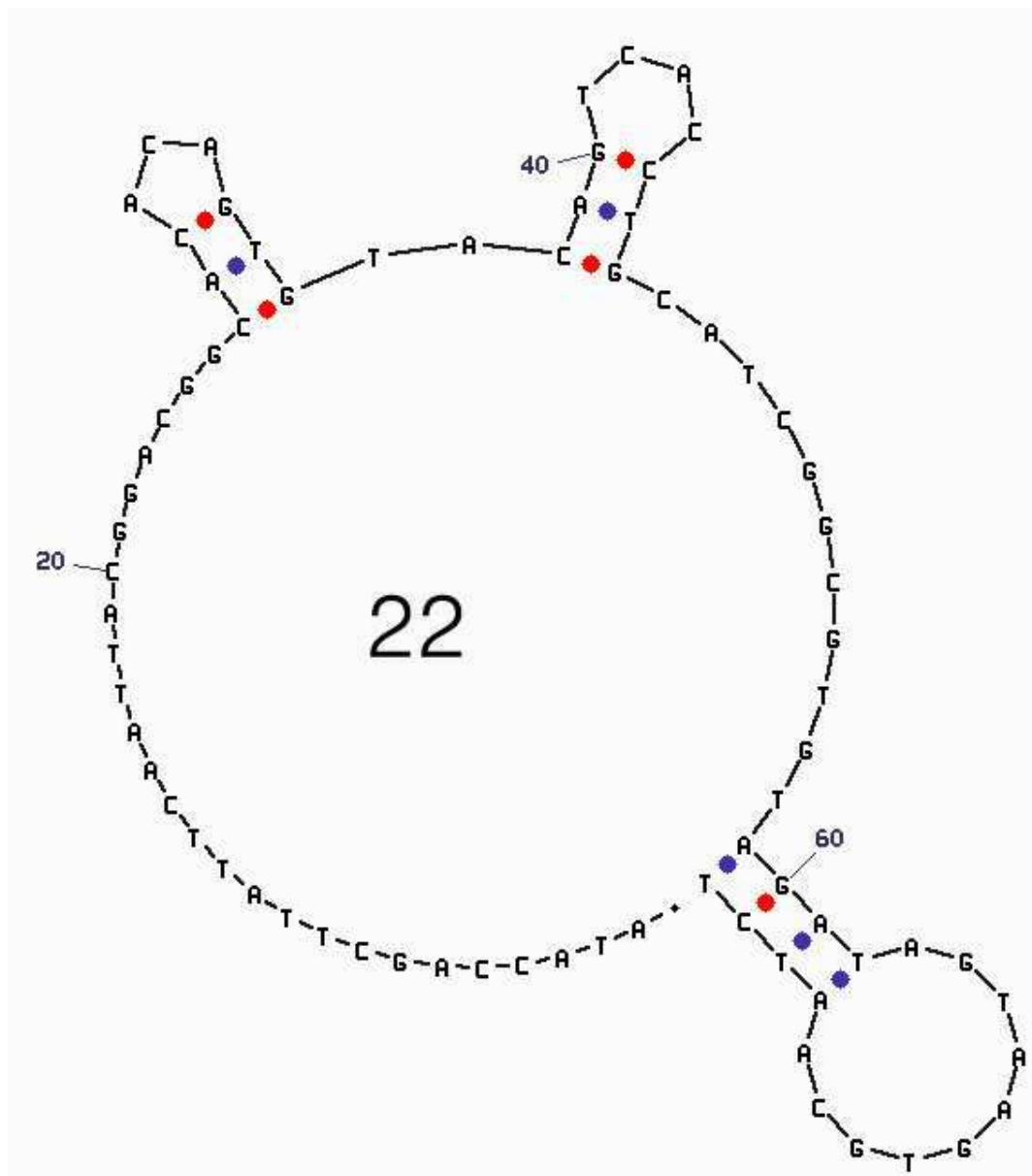
도면30



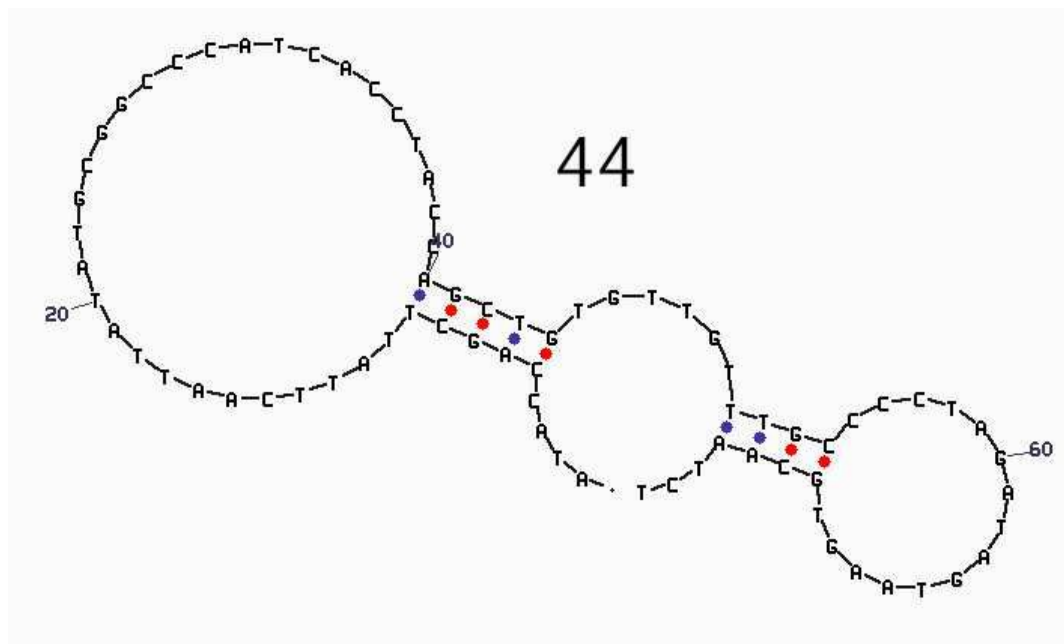
도면31



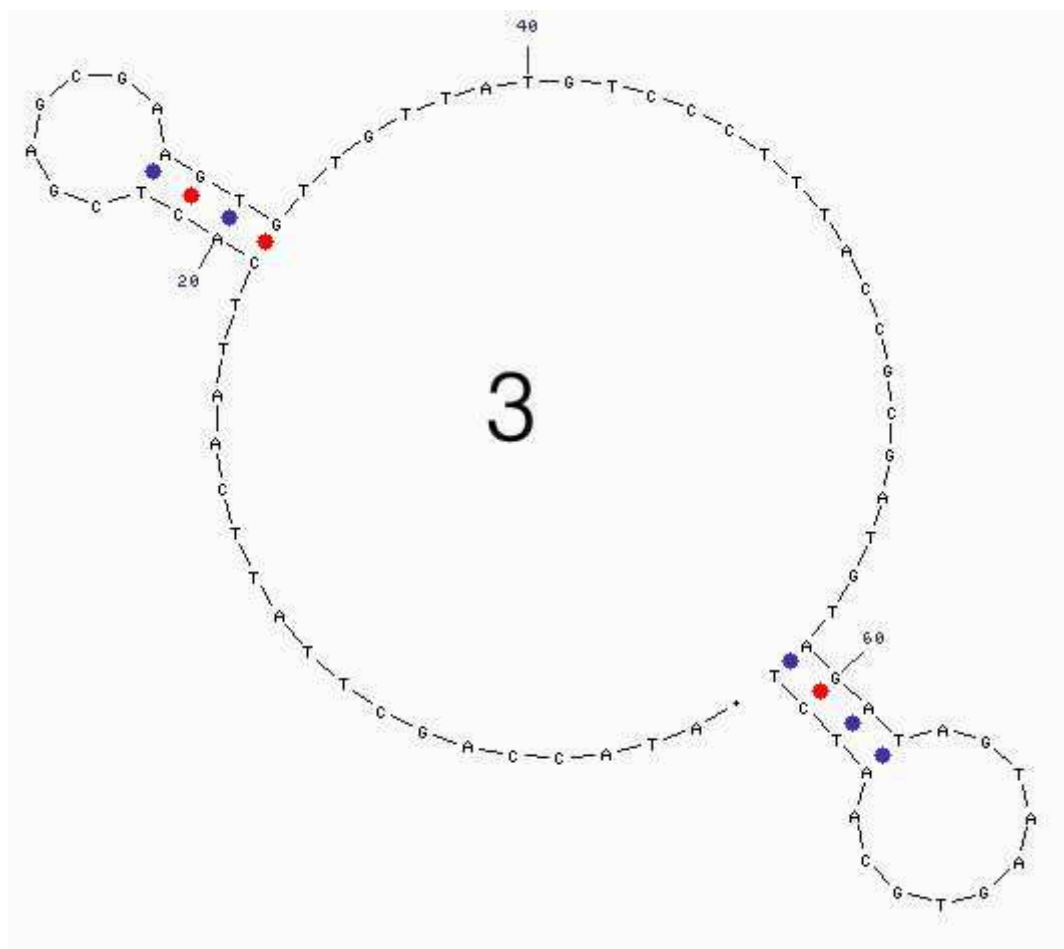
도면32



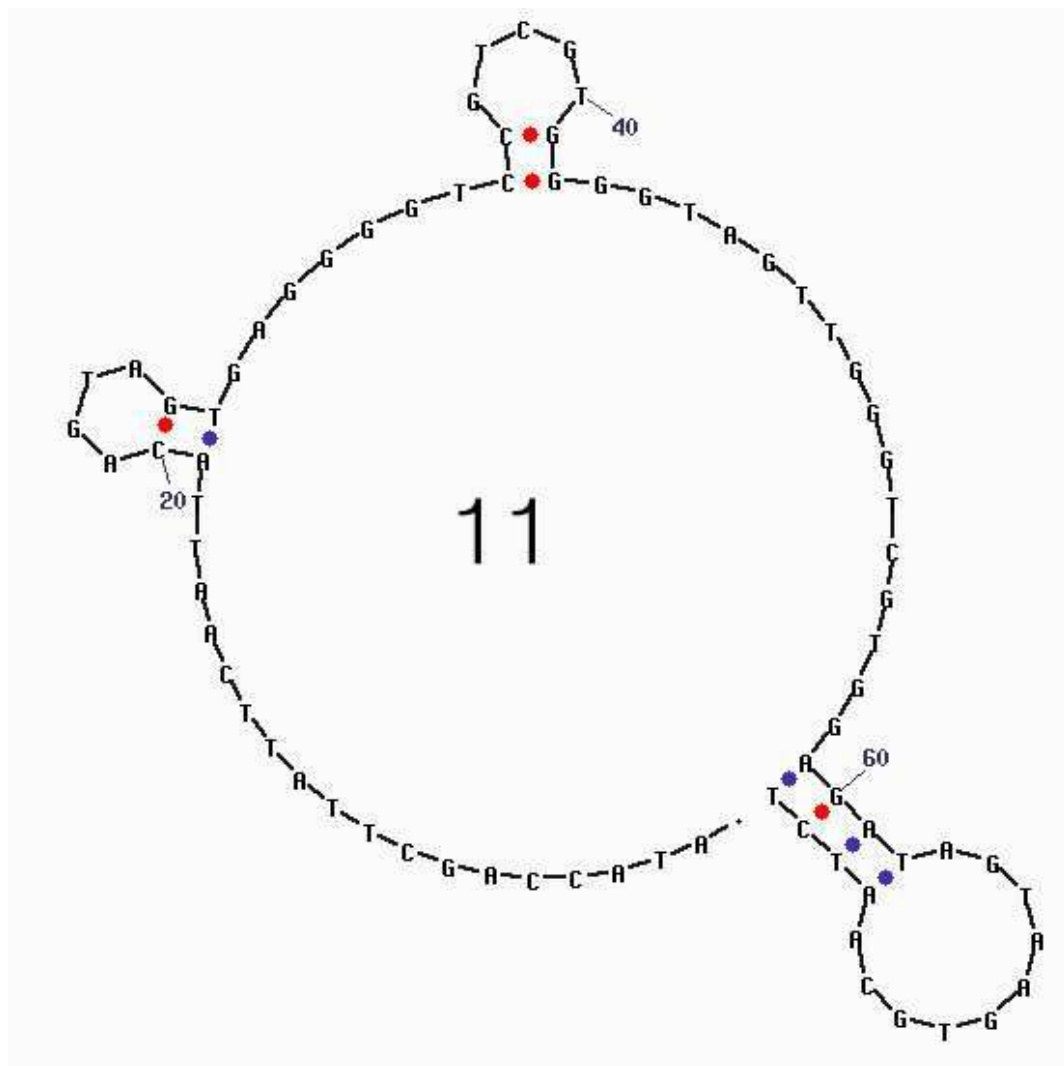
도면33



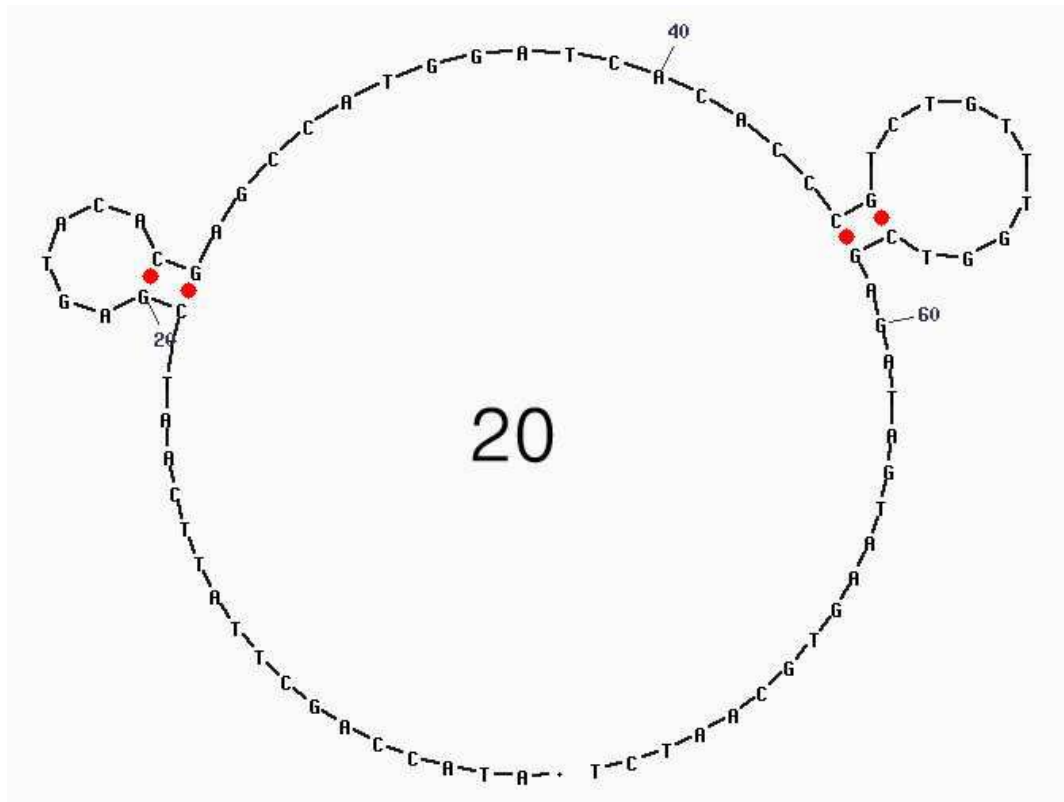
도면34



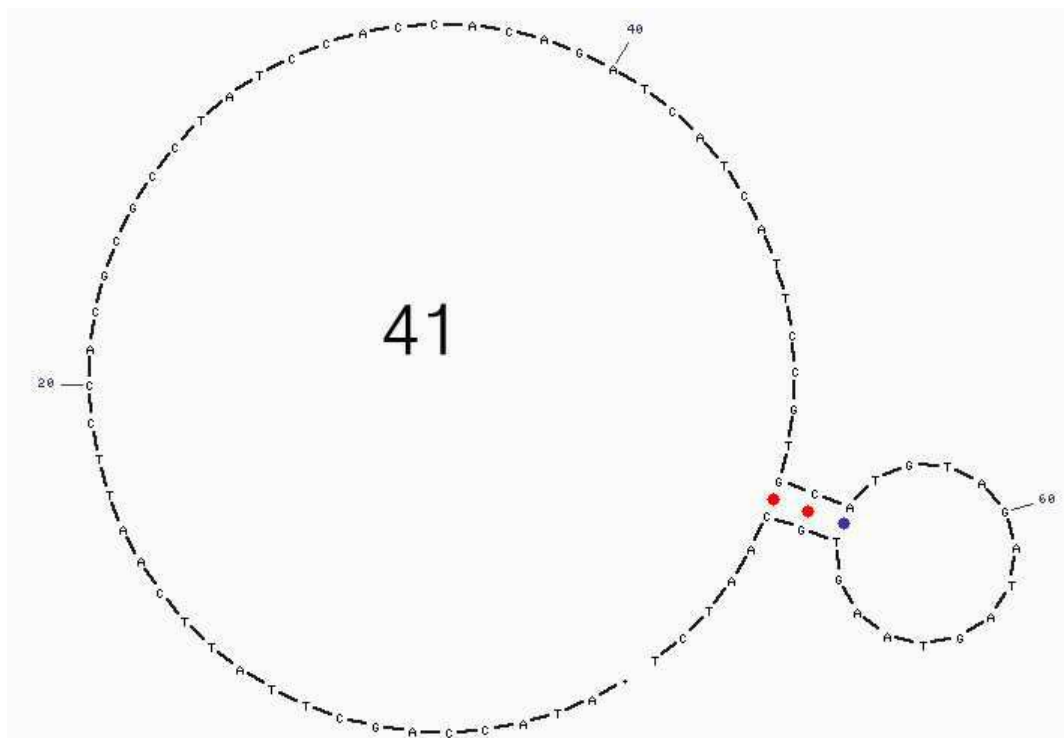
도면35



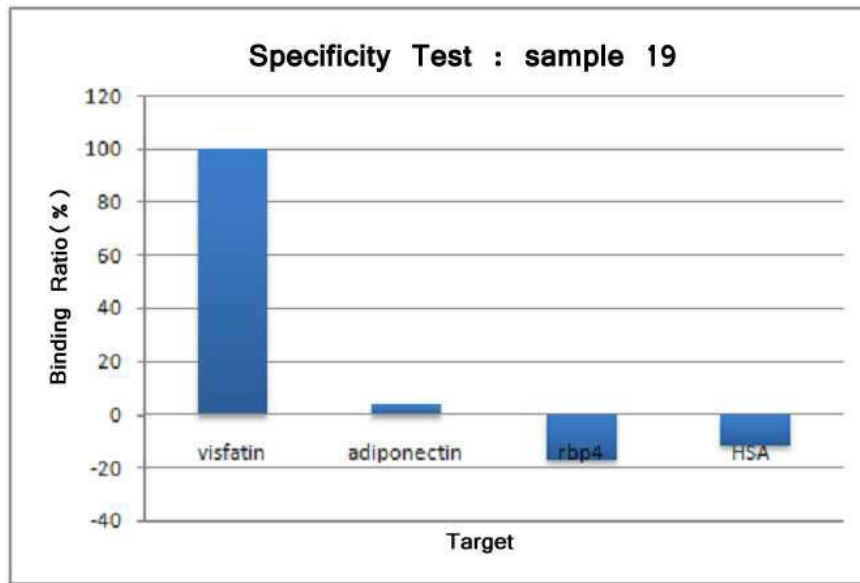
도면36



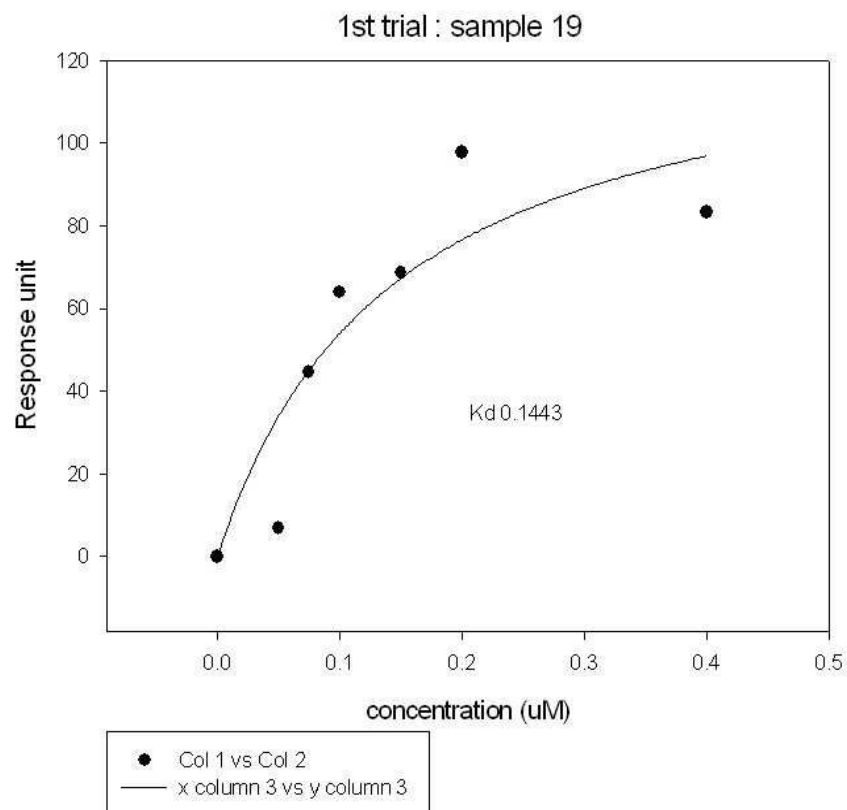
도면37



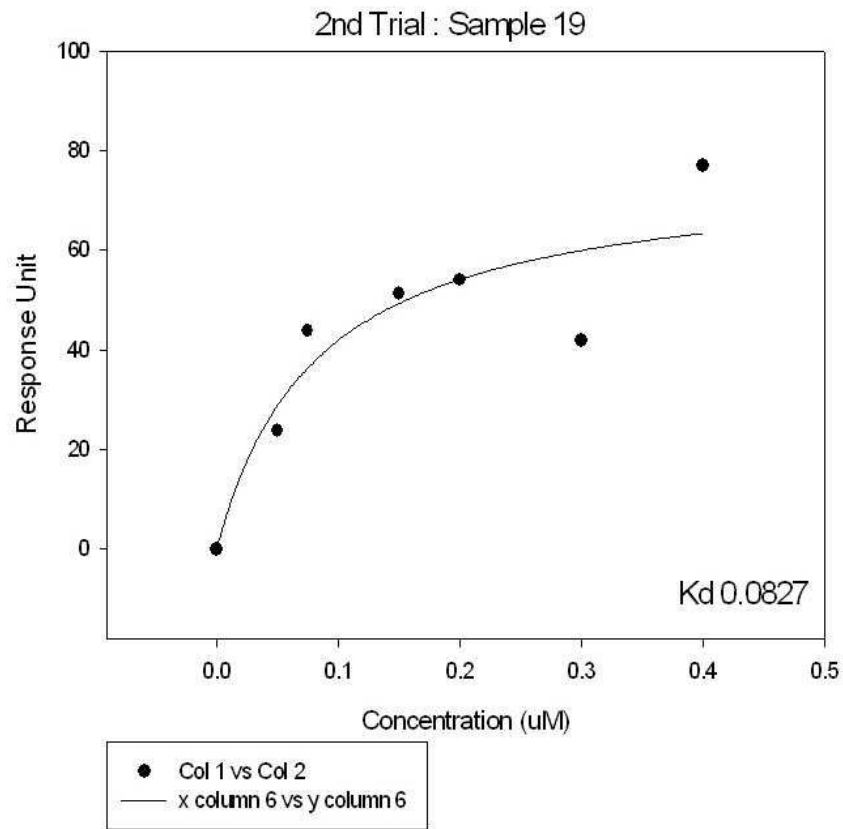
도면39



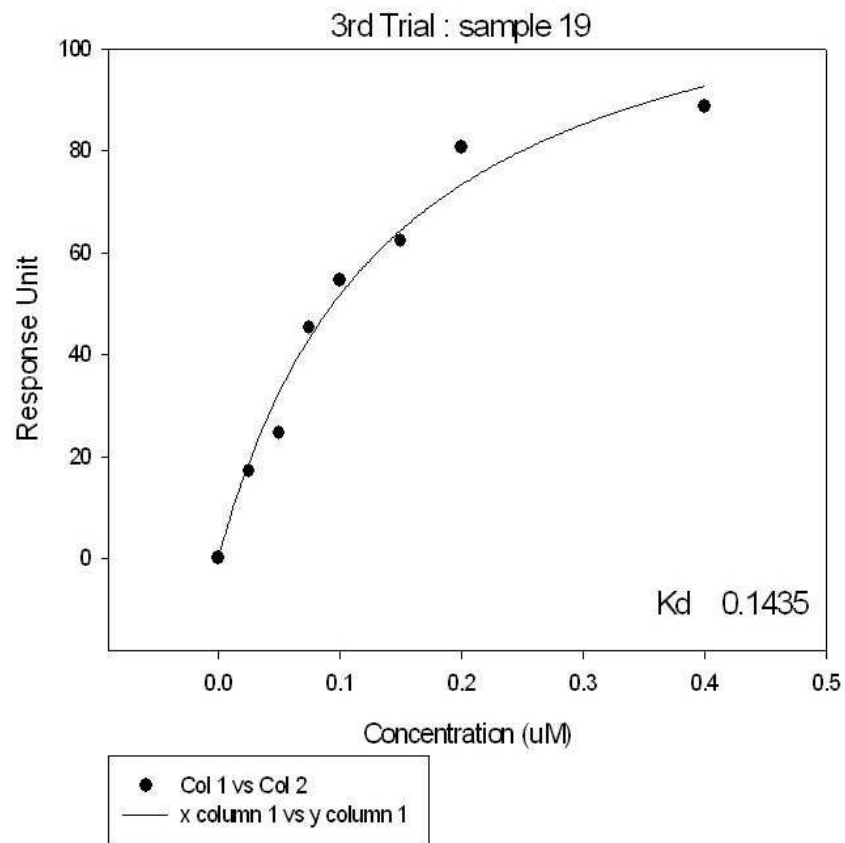
도면40a



도면40b



도면40c



서열 목록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
 <120> DNA aptamers binding to visfatin with specificity and production method thereof

<160> 36

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA aptamer

<400> 1

ataccagctt attcaattgg ccagggtcag ggtagtagga tatgtggtgg acgggcgtga 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 2
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 2
ataccagctt attcaattac gtagtcaacg ttgatactgc cactcgtgga tctgcggtag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 3
ataccagctt attcaattac gggcgggtcg acgtacgatt gcgggctggt gtgtgtccag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 4
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 4

ataccagctt attcaattgt aggtggcaac aggcggcccg ctaatagtat tgtatgtgca 60

gatagtaagt gcaatct 77

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 5
ataccagctt attcaattac gggcgggtcg acgtacgatt gcaggctggt gtgtgtggag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 6
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 6
ataccagctt attcaattgg aggcgggtac ggttcgatg tatggctggg gtcgtgtcga 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 7
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 7

ataccagctt attcaattat caggctgccc caatgtccgt ttgtcatgct ccagttggag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 8
ataccagctt attcaattgg cagcgatacg atggcggata taaggtgggg tgggcgtgag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 9
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 9
ataccagctt attcaattac gggcgggtcg acgtacgatt gcgggctggt gtgtgtcgag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 10
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 10

ataccagctt attcaattac gggcgggtcg acgtacgatt gcgggctggt gtgtgtggag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 11
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 11
ataccagctt attcaattgg gcacggcgag tgagcaatgg ttagggctgg gcgtgtggag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 12
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 12
ataccagctt attcaattga cagcgatacg gtggcggata taaggtgggg tgggcgtgag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 13

ataccagctt attcaattgg gcaggacagg tgcggcttg ataggctggg gtgtgtgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 14
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 14
ataccagctt attcaattag tcgtgtgtgc tgatcggtgg gcgcggatac ccccttggtg 60

gatagtaagt gcaatct 77

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 15
ataccagctt attcaattgg gcgggacaag tgcggcttg ataggctggg gtgtgtggag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 16

ataccagctt attcaattgc ggggacgaac ggactgcaca ttgcatatgg tggcgtcaag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 17
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 17
ataccagctt attcaattgg cgtcatatac agtaccgacg acgttgtcac cgacttatag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 18
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 18
ataccagctt attcaattgg ggcgggacag gtgtcggctt gataggctgg ggtgtgtgga 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 19
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 19

ataccagctt attcaattgg ggcagcggca caatggcgga aggtgggtat gggtcgtgga 60

gatagtaagt gcaatct 77

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 20
ataccagctt attcaattgg ttgtgttatg ccaccctact gcatcactat atcagcctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 21
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 21
ataccagctt attcaattgt ggtgcaacgg tcacatatca cgacgggtcc cgcagcctag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 22

ataccagctt attcaattgg gcacgttgcg gggtcgatga tatgctggga cgcggtggag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 23
ataccagctt attcaattac acgcgatgac attgttgccg cccgaccctg cegtgtgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 24
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 24
ataccagctt attcaattac acaccgagac cgcacttgta ctccttagcc gcctccgtag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 25
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 25

ataccagctt attcaattac ataccgagac cgcacttgta ctcccgtcgc atgttatgta 60

gatagtaagt gcaatct 77

<210> 26
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 26
ataccagctt attcaattac tacacgtgtg ttaggtccat acagcggcgc gtccatcgag 60

atagtaagtg caatc 75

<210> 27
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 27
ataccagctt attcaattgg gaggtggcg gtaggtggt ggtggtgtgt gtgccagat 60

agtaagtgca atct 74

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 28

ataccagctt attcaattac agtagtaagg ggtccgtcgt ggggtagttg ggtcgtggag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 29
ataccagctt attcaattgg gtacgtatga ccatcacagc tctatcctac acccctctag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 30
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 30
ataccagctt attcaattac ggacggcaca cagtgtacag tcacctgcat cggcgtgtag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 31

ataccagctt attcaattat atgcggccca tcacctacca gctgtgttgt ttgccctag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 32
ataccagctt attcaattca ctcgagcgaa gtgttgttat gtcctttac cgcgatgtag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 33
ataccagctt attcaattac agtagtgagg ggtccgtcgt ggggtagttg ggtcgtggag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 34

ataccagctt attcaattcg agtacacgag ccatggatca caccgctctg ttgggtcgag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 35
ataccagctt attcaattcc acgcgcctat ccaccacaga tcatcattcc gtgcatgtag 60

atagtaagtg caatct 76

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

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 36
ataccagctt attcaattgt acgatgacca ggccttcac gctccattca tccgtttag 60

atagtaagtg caatct 76