



БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomicsj.ru>



ПОЛУЧЕНИЕ АПТАСЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ОКСИТЕТРАЦИКЛИНА

Максимова В.О., Цветков В.О.

Башкирский государственный университет,
Россия, Уфа, 450076, Уфа, Заки Валиди, 32, e-mail: zv347@yandex.ru

Резюме

Актуальной задачей является разработка быстрого и доступного способа количественного определения остаточных количеств поллютантов, в частности, антибиотиков, в сельскохозяйственной и пищевой продукции, в том числе в меде. С использованием печатного электрода и доступных электронных компонентов получен ДНК-аптасенсор, позволяющий определять концентрацию коммерческого препарата окситетрациклина в водных растворах в диапазоне 1-100 ppm. Аптамеры получали методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) из библиотеки последовательностей, содержащих 50 случайных нуклеотидов, фланкированных 20-нуклеотидными последовательностями для отжига праймеров. Для проведения SELEX окситетрациклин иммобилизовали на микрочастицах 40%-ного полиакриламидного геля. Проводили 5 раундов SELEX, включающих отжиг ДНК на иммобилизованный окситетрациклин, отмывку микрочастиц от несвязавшейся ДНК центрифугированием, элюцию связанной ДНК нагреванием и последующую ПЦР. Аптамеры, содержащие аминолинк на 5'-конце, иммобилизовали на поверхности печатного электрода. Методом кондуктометрии показана прямая нелинейная зависимость отклика аптасенсора от концентрации окситетрациклина в диапазоне 1-100 ppm с чувствительностью от 2,5 до 0,02 мкСм/ppm. Методом циклической вольтамперометрии показана линейная зависимость величины анодного пика от десятичного логарифма концентрации окситетрациклина в диапазоне 1-100 ppm.

Ключевые слова: определение концентрации антибиотиков; окситетрациклин; биосенсоры; аптамеры; SELEX

Цитирование: Максимова В.О., Цветков В.О. Получение аптасенсоров для определения концентрации окситетрациклина // Биомика. 2019. Т.11(2). С. 158 - 166. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-15

OBTAINING AN APTASENSORS FOR QUANTIFICATION OF OXYTETRACYCLINE

Maksutova V.O., Tsvetkov V.O.

Bashkir State University, Russia, Ufa, 450076, Ufa, Zaki Validi 32, e-mail: zv347@yandex.ru

Resume

An actual task is to develop a quick and affordable way to quantify the residual amounts of pollutants in food, e.g. antibiotics in honey. A DNA-aptasensor was created to determine the concentration of oxytetracycline in aqueous solutions in range from 1 to 100 ppm using a screen printed electrode and affordable electronic components. The aptamers were obtained by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) from a library of sequences containing 50 random nucleotides flanked by 20-nucleotide sequences for primer annealing. To perform SELEX, the oxytetracycline was immobilized on the microparticles of 40% polyacrylamide gel. There were performed 5 rounds of SELEX, including DNA annealing on immobilized oxytetracycline, washing microparticles of unbound DNA by centrifugation, elution of bound DNA by heating and subsequent PCR. Aptamers containing aminolink at the 5' end were immobilized on the screen surface of printed electrode. The direct nonlinear relationship between the aptasensor response and the oxytetracycline concentration in the range of 1-100 ppm with a sensitivity of 2.5 to 0.02 μ S/ppm was shown by conductometry. The method of cyclic voltammetry shows the linear relationship between anode peak value and decimal logarithm of the oxytetracycline concentration in the range of 1-100 ppm.

Keywords: determination of antibiotic concentration; oxytetracycline; biosensors; aptamers; SELEX

Citation: Maksutova V.O., Tsvetkov V.O. Obtaining an aptasensors for quantification of oxytetracycline. *Biomics*. 2019. T.11(2). С. 158 - 166. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-15 (In Russian)

Введение

Серьезной проблемой отечественного пчеловодства является присутствие в мёде остаточных количеств антибиотиков [Динков и др. (Dinkov et al.), 2006]. В настоящее время в практике аналитических лабораторий для определения содержания антибиотиков в продуктах пчеловодства используются методы культивирования бактерий, иммуноферментного анализа [ГОСТ (GOST) 31903-2012; ГОСТ (GOST) R 54655-2011], высокоэффективной жидкостной хроматографии и другие [Mehlhorn, Rahimi, Joseph, 2018], требующие значительного времени для проведения опыта и использования дорогостоящих реактивов и оборудования. В связи с высокой практической востребованностью подобных анализов актуальной является задача разработки быстрого и доступного метода определения малых количеств антибиотиков.

Одним из перспективных подходов к созданию таких экспресс-тест-систем является применение электрохимических биосенсоров [Viswanathan, Radecka, Radecki, 2009]. Биосенсор состоит из чувствительного элемента (электрода, трансдьюсера), на котором иммобилизована биоселектирующая молекула, и электрического устройства [Thevenot et al., 2001; Grieshaber et al., 2008]. Биоселектирующая молекула избирательно взаимодействует с молекулами измеряемого вещества в растворе. При этом изменяются электрохимические параметры раствора в области контакта с электродом, что может быть измерено с помощью электрического устройства. Величина отклика биосенсора зависит от концентрации определяемой молекулы. В соответствии с природой реакций, протекающих на электроде, выделяют потенциометрические, амперометрические, кондуктометрические и другие биосенсоры.

Разработке биосенсоров для определения пестицидов в сельскохозяйственной продукции и пище посвящен ряд публикаций последних лет. Так, кондуктометрический биосенсор на основе органофосфатгидролазы *Pseudomonas putida* может быть использован для определения остатков фосфорорганических пестицидов в сельскохозяйственной продукции [Zhang et al., 2014; Mulyasuryani, Prasetyawan, 2015; Mishra et al., 2018]. Значительное количество разрабатываемых в настоящее время биосенсоров, в том числе для определения антибиотиков, в качестве биоселектирующей молекулы используют аптамеры [Chen et al., 2014; Mehlhorn, Rahimi, Joseph, 2018]. Аптамеры – это олигонуклеотиды, способные

специфично связываться с мишенью – малой молекулой, макромолекулой или клеткой. Связывание аптамера с мишенью обеспечивается за счет нековалентных взаимодействий и стерического соответствия [Syed, Pervaiz, 2010]. Распространенным способом получения аптамеров является систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, SELEX). Для получения аптамеров методом SELEX используется библиотека – набор олигонуклеотидов со случайными последовательностями, которые инкубируются совместно с иммобилизованной молекулой-мишенью. Олигонуклеотиды, связавшиеся с мишенью (т.е. наиболее специфичные), затем элюируются, амплифицируются и вновь инкубируются с мишенью; такой цикл повторяется от 5 до 15 раз [Irvine, Tuerk, Gold, 1991; Han, Liang, Zhou, 2010; Lakhin, Tarantul, Gening, 2013]. Таким образом отбирается небольшое количество последовательностей олигонуклеотидов, специфично связывающихся с мишенью, т.е. аптамеров.

Целью данной работы было исследование возможности получения аптасенсоров, позволяющих определять концентрацию окситетрациклина в водном растворе, с использованием доступных материалов и экспериментальных техник.

Материалы и методы

В опытах использован коммерческий препарат окситетрациклина отечественного производства.

Реактивы

В опытах применяли следующие реактивы: трис-гидроксиметиламинометан, тетраметилэтилендиамин (Sigma), акриламид (Biochemica), метиленбисакриламид, персульфат аммония (Fluka), глутаровый альдегид (Panreac), альбумин бычий сывороточный (Диаэм), Таq-полимераза (Fermentas), набор дНТФ (Хеликон), ЭДТА, уксусная кислота ледяная, дигидрофосфат натрия, гидрофосфат натрия, бромид этидия.

Получение иммобилизованного окситетрациклина

В качестве твердого носителя для иммобилизации окситетрациклина использовали 40%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) с высокой долей поперечных сшивок (24% акриламида, 16% метиленбисакриламида). Окситетрациклин добавляли к ПААГ до конечной концентрации 1% одновременно с полимеризацией. ПААГ гомогенизировали в ножевом гомогенизаторе до получения частиц размером менее 10 мкм и выдерживали в глутаровом альдегиде в течение 10 часов при 37°C. Полученный сорбент десять раз промывали дистиллированной

водой (центрифугировали и ресуспендировали) и использовали в дальнейших опытах.

Иммобилизацию антибиотика на ПААГ подтверждали реакцией сорбента на окситетрациклин с концентрированной азотной кислотой: положительным контролем служил раствор окситетрациклина; отрицательным контролем – ПААГ без окситетрациклина.

Подбор праймеров и синтез олигонуклеотидов

В качестве аптамеров, как правило, используются одноцепочечные ДНК или РНК длиной от 20 до 50 оснований [Mercier, Dontenwill, Choulier, 2017]. Считается, что РНК-аптамеры способны образовывать большее разнообразие структур, однако их использование сопряжено с рядом сложностей, в первую очередь связанных с их амплификацией [Zhou, Rossi, 2016]. В наших опытах использовалась рандомизированная последовательность ДНК длиной 50 оснований, фланкированная последовательностями для отжига праймеров; длина использованной ДНК составляла 90 оснований.

Для выбора праймеров для ПЦР генерировали последовательность случайных нуклеотидов ДНК длиной 20 оснований с помощью самостоятельно написанной компьютерной программы. Полученные последовательности анализировали на предмет возможности использования в качестве праймеров с помощью программы «OligoCalc» [Kibbe, 2007]. В результате были выбраны следующие последовательности праймеров: прямой 5'-GTCGTAGAGGTCTTGTGAAG-3' и обратный 5'-CCGCAGTCGAGGAGTGTATT-3'.

Синтез выбранных последовательностей олигонуклеотидов заказывали в компании «Lumiprobe», г. Москва. На 5'-конец праймеров был добавлен амиолинк на основе аминоксанола -O-(CH₂)₆-NH₂ для облегчения иммобилизации.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию проводили в ДНК-амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология) в соответствии с рекомендациями производителя Taq-полимеразы. Реакционные смеси объемом 50 мкл содержали 0,2 нМ (28 нг) ДНК-матрицы, 0,2 мкМ праймеров, 1,25 ед. акт. Taq-полимеразы, 0,2 мМ dНТФ, 5 мкл 10х-буфера (100 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 500 мМ KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40), 1 мМ MgCl₂. Амплификация включала начальную денатурацию при 94°C (3 мин); 40 циклов – денатурация при 94°C (15 сек), отжиг при 60°C (40 сек), элонгация при 72°C (30 сек); финальную элонгацию при 72°C (2 мин).

Электрофорез олигонуклеотидов

Электрофорез олигонуклеотидов проводили в 10%-ном полиакриламидном геле при напряженности электрического поля 10 В/см. В качестве

электродного буфера и буферного раствора в составе геля использовали трис-ацетатный буфер.

Для контроля хода разделения в отдельную дорожку наносили маркеры длин ДНК «50+ bp DNA Ladder» (Helicon). Гели окрашивали бромистым этидием.

Получение аптамеров

Получение аптамеров проводили в соответствии со следующими протоколами.

Способ № 1 (элюция избытком окситетрациклина). Продукт ПЦР добавляли к суспензии микрочастиц с иммобилизованным окситетрациклином. Смесь инкубировали при 20°C в течение 1 часа. Смесь центрифугировали, осадок ресуспендировали в насыщенном растворе окситетрациклина и центрифугировали снова. Супернатант использовали как матрицу для ПЦР (следующий раунд).

Способ № 2 (отжиг и элюция нагреванием). Суспензию микрочастиц с иммобилизованным окситетрациклином нагревали до 95°C на водяной бане. К суспензии добавляли продукт ПЦР. Смесь охлаждали с 95°C до 20°C в течение 1 часа. Смесь центрифугировали, осадок ресуспендировали, нагревали до 95°C и немедленно центрифугировали снова. Супернатант использовали как матрицу для ПЦР (следующий раунд).

Иммобилизация биоселектирующих молекул

30 мкл 10%-ного альбумина и 2%-ного глицерина наносили на поверхность электрода, высушивали при комнатной температуре, денатурировали при 70°C в течение 20 минут. Помещали электрод в 5%-ный глутаровый альдегид и выдерживали 30 минут. Промывали дистиллированной водой, высушивали. Наносили на поверхность электрода 30 мкл раствора биоселектирующей молекулы с концентрацией 1 мг/мл, высушивали. Помещали электрод в 5%-ный глутаровый альдегид и выдерживали 30 минут при комнатной температуре. Промывали дистиллированной водой, высушивали.

Электрохимические измерения

Для проведения электрохимических измерений использовали оригинальную измерительную установку на основе программируемой микросхемы Atmega-328. За основу для создания измерительной установки брали устройства, описанные в [Joshi, Relekar, Sutrave, 2017; Meloni, 2016]. Для формирования выходного сигнала использовали фильтр высоких частот (RC-фильтр), для формирования входного сигнала – операционные усилители в составе интегральной микросхемы LM-324 с отрицательной обратной связью.

В опытах использовали печатные электроды с площадью контактной поверхности 1 мм². Измерения

проводили в растворах окситетрациклина на основе 0,2 М-ного фосфатного буфера, рН 7.

Для проведения кондуктометрических измерений использовали трехэлектродную схему, включающую электрод сравнения, рабочий (с иммобилизованным биоселектором) и вспомогательный электроды. Опорное напряжение подавалось на вспомогательный электрод. Отклик биосенсора определяли как разницу между напряжением на рабочем электроде и напряжением на электроде сравнения. Для уменьшения эффекта электролиза во время измерений использовали переменное напряжение с частотой 16 кГц.

Вольтамперометрические измерения проводили при величине развертки потенциала от -1 до +1 В и скорости развертки потенциала 1,3 В/мин.

Данные с измерительной установки считывали через монитор последовательного порта персонального компьютера и обрабатывали в программе Microsoft Excel. Измерения проводили не менее трех раз. На диаграммах рассеяния показаны средние значения. В качестве величины погрешности показан доверительный интервал (уровень надежности 95%).

Результаты и обсуждение

Иммобилизованный окситетрациклин

Для получения аптамеров как к макромолекулам, так и к малым молекулам целевой анализ необходимо иммобилизовать на каком-либо носителе, чтобы иметь возможность отделять его от раствора [Ruscito, DeRosa, 2016]. Мы использовали окситетрациклин, иммобилизованный с помощью глутарового альдегида на микрочастицах 40%-ного ПААГ. Полученные микрочастицы давали положительную цветную качественную реакцию на окситетрациклин, были способны образовывать водную суспензию без расслаивания в течение как минимум одного часа, в то же время легко осаждались центрифугированием при 10 000 g.

SELEX

Систематическая эволюция лиганда экспоненциальным обогащением включает следующие последовательные шаги: инкубацию олигонуклеотидов с иммобилизованной целевой молекулой (связывание); отмывку от несвязавшихся олигонуклеотидов (обычно с использованием центрифугирования); элюцию связанных с целевой молекулой олигонуклеотидов; ПЦР элюата и использование продукта ПЦР в новом раунде [Yang et al., 2010]. Типичная процедура SELEX включает 5-15 раундов [Lakhin et al., 2013]. В наших экспериментах SELEX включал 5 раундов, в каждом из них использовались одинаковые условия связывания и элюции (Рис. 1).

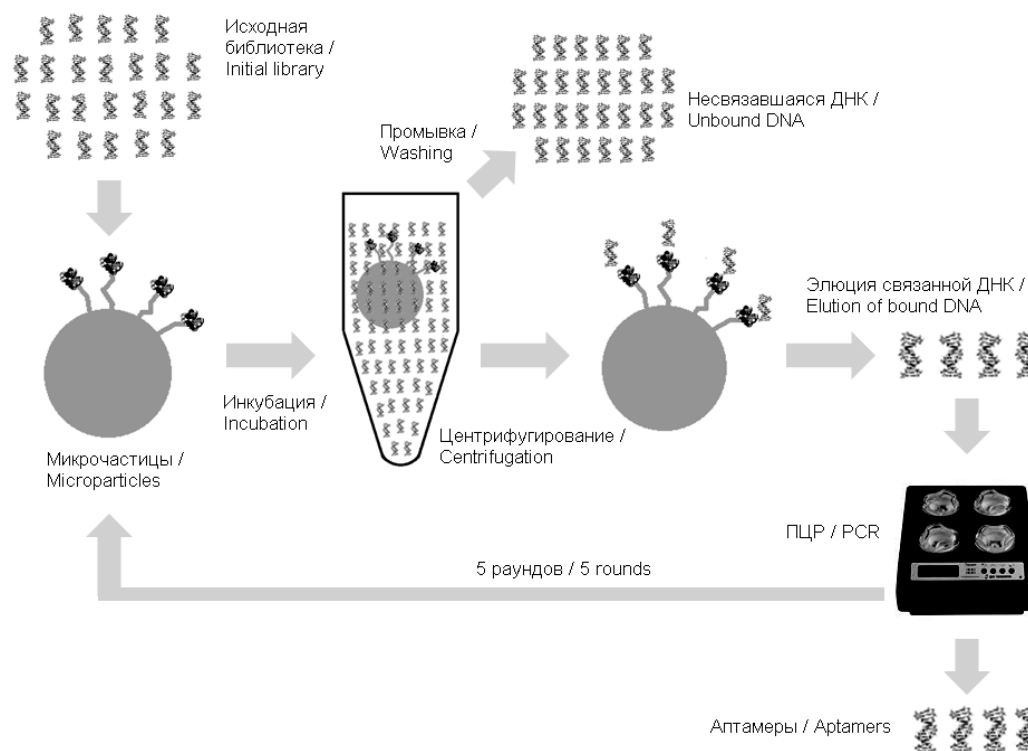


Рисунок 1. Схема проведения SELEX.
Figure 1. The scheme of SELEX that we used.

В одном из вариантов SELEX (способ № 1) элюцию олигонуклеотидов с иммобилизованного на микрочастицах окситетрациклина производили добавлением к микрочастицам насыщенного раствора окситетрациклина, предполагая, что при этом произойдет связывание олигонуклеотидов по конкурентному механизму со свободным окситетрациклином, присутствующим в суспензии в намного большей концентрации по сравнению со связанным окситетрациклином. В результате SELEX с использованием данной техники эксперимента не удалось получить препарата, содержащего ДНК. Возможной причиной этого является отсутствие элюции, однако более вероятной причиной представляется ингибирование ПЦР окситетрациклином, присутствовавшим в реакционной смеси в чрезвычайно высокой концентрации.

В другом варианте SELEX (способ № 2) связывание олигонуклеотидов с микрочастицами проводили при понижении температуры смеси с 95°C до комнатной температуры в течение одного часа, фиксируя олигонуклеотиды на иммобилизованном окситетрациклине. Соответственно, элюцию осуществляли простым нагреванием смеси. В пользу использования такой техники эксперимента говорит предположение о возможной существенной роли водородных связей в связывании окситетрациклина с ДНК, поскольку в молекуле окситетрациклина имеется несколько доноров и акцепторов водородной связи. С использованием данной техники эксперимента после 5 раундов SELEX была получена ДНК размером около 100 пар оснований (Рис. 2).

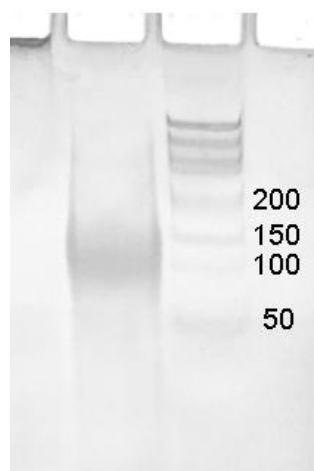


Рисунок 2. Электрофорез продуктов SELEX.
Figure 2. The electrophoresis of the SELEX products.

Полученная ДНК была иммобилизована на электрод, с использованием которого были проведены электрохимические измерения в растворах с различной концентрацией окситетрациклина.

Электрохимические измерения

Кондуктометрические устройства измеряют способность аналита проводить электрический ток между электродами. В большинстве случаев кондуктометрические устройства предполагают использование ферментных электродов, где ионная сила и, следовательно, проводимость раствора между двумя электродами изменяется в результате ферментативной реакции [D'Orazio, 2003]. Именно кондуктометрические биосенсоры обычно используются для клинических анализов и мониторинга состояния окружающей среды [Zhu, Shi, 2019].

Для проведения кондуктометрических измерений использовали экспериментальную измерительную установку на основе программируемой микросхемы Atmega-328 с операционным усилителем для повышения чувствительности регистрируемого сигнала. Полученное устройство позволяло определять изменение проводимости раствора с разрешением 0,1 мкСм. Методом кондуктометрии исследовали отклик полученного аптасенсора в растворах окситетрациклина с концентрацией 0-100 ppm. Значения стабилизировались не более чем за 10 секунд, при повторных измерениях значения отличались не более чем на 2 мкСм.

Полученная ДНК в качестве биоселектора показала прямую зависимость отклика от концентрации окситетрациклина (Рис. 3а). Чувствительность биосенсора (наклон кривой) составляет 2,5 мкСм/ppm в области низких концентраций и 0,02 мкСм/ppm в области концентраций от 50 до 100 ppm. Исходную библиотеку последовательностей ДНК также иммобилизовали на электрод и проводили аналогичные измерения. Биосенсоры с исходной библиотекой показывали одинаковые значения проводимости в растворах окситетрациклина с различной концентрацией (Рис. 3б), что свидетельствует о формировании отклика биосенсора за счет взаимодействия окситетрациклина со специфической ДНК.

Также были проведены измерения методом циклической вольтамперометрии, позволяющей детектировать присутствие и концентрацию отдельных ионов в растворе. Под действием циклически изменяющегося напряжения в растворе за счет присутствия ионов с различной подвижностью образуются пики тока.

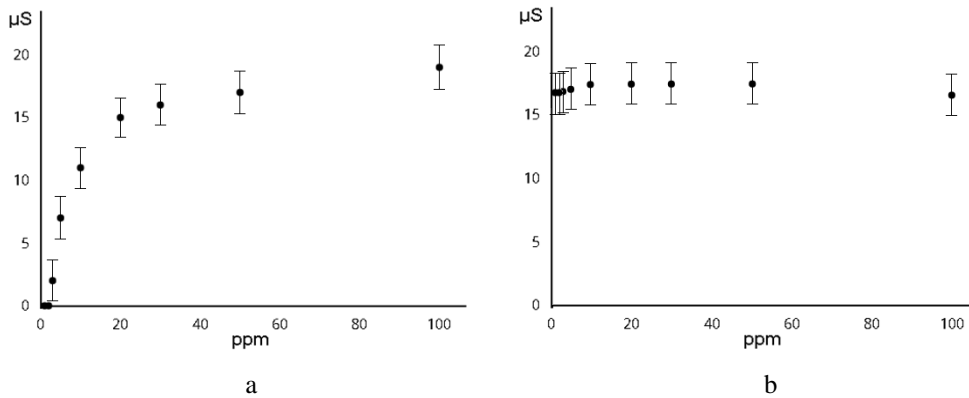


Рисунок 3. Отклик биосенсора с иммобилизованными аптамерами (а) и со случайной последовательностью ДНК (b) при различных концентрациях окситетрациклина (1–100 ppm).
 Figure 3. Conductometric measurements of the biosensor responses with the aptamers (a) and a random DNA (b) at the different concentrations of oxytetracycline (1 to 100 ppm).

С использованием исследуемых биосенсоров были получены вольтамперограммы, которые имеют характерную для растворов биомолекул форму с отсутствием ярко выраженных пиков (Рис. 4а). Вольтамперограммы усечены в верхней части из-за

превышения диапазона входного сигнала используемой установки. Тем не менее, можно отметить взаимосвязь формы кривой и концентрации окситетрациклина (Рис. 4b).

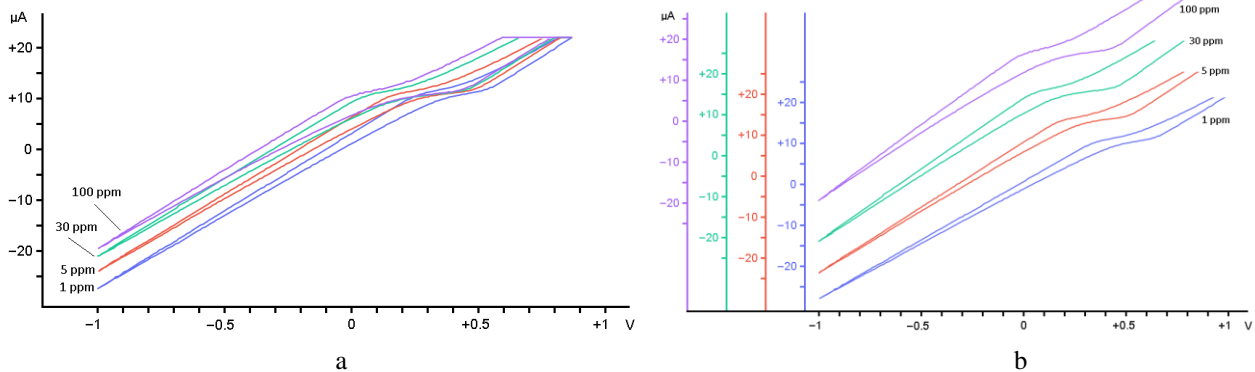


Рисунок 4. Циклические вольтамперограммы аптасенсора в растворах с 1, 5, 30 и 100 ppm окситетрациклина.
 Figure 4. Cyclic voltammograms of the aptasensor at 1, 5, 30, and 100 ppm of oxytetracycline.

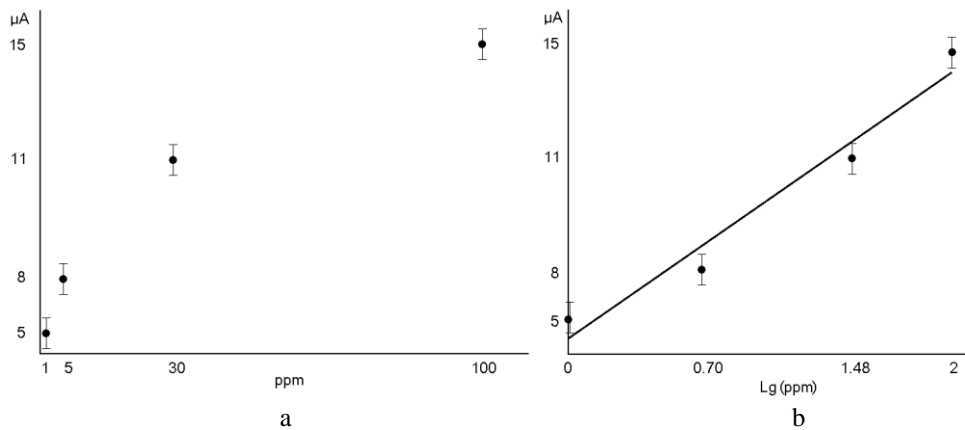


Рисунок 5. Зависимость величины анодного пика от концентрации окситетрациклина, ppm (а) и Lg(ppm) (b).
 Figure 5. Dependence of anodic peak value on oxytetracycline concentration, ppm (a) and Lg(ppm) (b).

Зависимость величины анодного пика от десятичного логарифма концентрации окситетрациклина может быть описана линейной функцией (Рис. 5).

Таким образом, в данной работе получены ДНК-аптамеры к коммерческому препарату окситетрациклина; с использованием доступных электронных компонентов создан аптасенсор, позволяющий определять концентрацию окситетрациклина в водных растворах в диапазоне от 1 до 20 ppm с чувствительностью 2.5 мкСм/ppm и погрешностью около 1 ppm. Полученные результаты могут стать основой для разработки быстрого и доступного метода определения антибиотиков в продуктах пчеловодства.

Работа выполнена частично при поддержке Фонда содействия инновациям, № соглашения 14332ГУ/2019.

Литература

- ГОСТ 31903-2012 Продукты пищевые. Экспресс-метод определения антибиотиков. / Введ. 2013-07-01. М.: Стандартинформ, 2013. 8 с. <http://vsegost.com/Catalog/53/53615.shtml>
- ГОСТ Р 54655-2011 Мед натуральный. Метод определения антибиотиков. / Введ. 2013-01-01. М.: Стандартинформ, 2012. 14 с. <http://vsegost.com/Catalog/51/51671.shtml>
- Динков Д, Канелов И., Желяжкова И., Вашин И. Сохранение тетрациклина и окситетрациклина в меде после неправильного применения этих антибиотиков в пчелиных семьях // Российский ветеринарный журнал. 2006. №1. С. 42-43.
- Chen D., Yao D., Xie C., Liu D. Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline // *Food Control*. 2014. V. 42. P. 109-115. doi:10.1016/j.foodcont.2014.01.018
- D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry // *Clinica Chimica Acta*. 2003. V. 334(1-2). P. 41-69. doi:10.1016/s0009-8981(03)00241-9
- Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures // *Sensors*. 2008. V. 8(3). P. 1400-1458. doi:10.3390/s80314000
- Han K., Liang Z., Zhou N. Design strategies for aptamer-based biosensors // *Sensors*. 2010. V. 10(5). P. 4541-4557. doi:10.3390/s100504541
- Irvine D., Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis // *Journal of Molecular Biology*. 1991. V. 222(3). P. 739-761. doi:10.1016/0022-2836(91)90509-5
- Joshi P.S., Relekar A.S., Sutrave D.S. Development of a cyclic voltammetry system by designing a low cost // *International Journal of Current Research*. 2017. V. 9. P. 51072-51075.
- Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator // *Nucleic Acids Research*. 2007. V. 35. P. 43-46. doi:10.1093/nar/gkm234
- Lakhin A.V., Tarantul V.Z., Gening L.V. Aptamers: problems, solutions and prospects // *Acta Naturae*. 2013. V. 5(4). P. 34-43.
- Mehlhorn A., Rahimi P., Joseph Y. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review // *Biosensors*. 2018. V. 8(2). P. 54. doi:10.3390/bios8020054
- Meloni G.N. Building a microcontroller based potentiostat: a inexpensive and versatile platform for teaching electrochemistry and instrumentation // *Journal of Chemical Education*. 2016. V. 93(7). P. 1320-1322. doi:10.1021/acs.jchemed.5b00961
- Mercier M.C., Dontenwill M., Choulier L. Selection of nucleic acid aptamers targeting tumor cell-surface protein biomarkers // *Cancers*. 2017. V. 9(6). doi:10.3390/cancers9060069
- Mishra G., Barfidokht A., Tehrani F., Mishra R. Food safety analysis using electrochemical biosensors // *Foods*. 2018. V. 7(9). P. 141. doi:10.3390/foods7090141
- Mulyasuryani A., Prasetyawan S. Organophosphate hydrolase in conductometric biosensor for the detection of organophosphate pesticides // *Analytical Chemistry Insights*. 2015. V. 10. P. 23-27. doi:10.4137/aci.s30656
- Ruscito A., DeRosa M.C. Small-molecule binding aptamers: selection strategies, characterization, and applications // *Frontiers in Chemistry*. 2016. V. 4. Article. 14. doi:10.3389/fchem.2016.00014
- Syed M.A., Pervaiz S. Advances in aptamers // *Oligonucleotides*. 2010. V. 20(5). P. 215-224. doi:10.1089/oli.2010.0234
- Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification // *Biosensors Bioelectronics*. 2001. V. 16(1-2). P. 121-131. doi:10.1016/s0956-5663(01)00115-4
- Viswanathan S., Radecka H., Radecki J. Electrochemical biosensors for food analysis // *Monatshfte fuer Chemie. Chemical Monthly*. 2009. V. 140(8). P. 891-899. doi:10.1007/s00706-009-0143-5

21. Yang X., Li N., Gorenstein D.G. Strategies for the discovery of therapeutic aptamers // *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2010. V. 6(1). P. 75-87. doi:10.1517/17460441.2011.537321
 22. Zhang W., Asiri A.M., Liu D., Du D., Lin Y. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014. V. 54. P. 1-10. doi:10.1016/j.trac.2013.10.007
 23. Zhou J., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016. V. 16(3). P. 181-202. doi:10.1038/nrd.2016.199
 24. Zhu X., Shi L. Nano-inspired biosensors for protein assay with clinical applications // *Electrochemistry*. 2019. P. 209-236. doi:10.1016/b978-0-12-815053-5.00009-x
- References**
1. Chen D., Yao D., Xie C., Liu D. Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline. *Food Control*. 2014. V. 42. P. 109-115. doi:10.1016/j.foodcont.2014.01.018
 2. Dinkov D., Kanelov I., Zheljazkova I., Vashin I.V. Sohranenie tetraciklina i oksitetraciklina v mede posle nepravil'nogo primenenija jetih antibiotikov v pchelinyh sem'jah. *Rossijskij veterinarnyj zhurnal*. 2006. №1. S. 42-43. [Keeping of tetracycline and oxytetracycline in honey after improper use of these antibiotics in bee colonies]. (In Russian).
 3. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2003. V. 334(1-2). P. 41-69. doi:10.1016/s0009-8981(03)00241-9
 4. GOST 31903-2012 Produkty pishhevye. Jekspressmetod opredelenija antibiotikov. Vved. 2013-07-01. M.: Standartinform, 2013. 8 s. [Food products. Express method for the determination of antibiotics]. (In Russian). <http://vsegost.com/Catalog/53/53615.shtml>
 5. GOST R 54655-2011 Med natural'nyj. Metod opredelenija antibiotikov. Vved. 2013-01-01. M.: Standartinform, 2012. 14 s. [Natural honey. Method for the determination of antibiotics]. (In Russian). <http://vsegost.com/Catalog/51/51671.shtml>
 6. Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sensors*. 2008. V. 8(3). P. 1400-1458. doi:10.3390/s80314000
 7. Han K., Liang Z., Zhou N. Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors*. 2010. V. 10(5). P. 4541-4557. doi:10.3390/s100504541
 8. Irvine D., Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *Journal of Molecular Biology*. 1991. V. 222(3). P. 739-761. doi:10.1016/0022-2836(91)90509-5
 9. Joshi P.S., Relekar A.S., Sutrave D.S. Development of a cyclic voltammetry system by designing a low cost. *International Journal of Current Research*. 2017. V. 9. P. 51072-51075.
 10. Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*. 2007. V. 35. P. 43-46. doi:10.1093/nar/gkm234
 11. Lakhin A.V., Tarantul V.Z., Gening L.V. Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae*. 2013. V. 5(4). P. 34-43.
 12. Mehlhorn A., Rahimi P., Joseph Y. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review. *Biosensors*. 2018. V. 8(2). P. 54. doi:10.3390/bios8020054
 13. Meloni G.N. Building a microcontroller based potentiostat: a inexpensive and versatile platform for teaching electrochemistry and instrumentation. *Journal of Chemical Education*. 2016. V. 93(7). P. 1320-1322. doi:10.1021/acs.jchemed.5b00961
 14. Mercier M.C., Dontenwill M., Choulier L. Selection of nucleic acid aptamers targeting tumor cell-surface protein biomarkers. *Cancers*. 2017. V. 9(6). doi: 10.3390/cancers9060069
 15. Mishra G., Barfidokht A., Tehrani F., Mishra R. Food safety analysis using electrochemical biosensors. *Foods*. 2018. V. 7(9). P. 141. doi:10.3390/foods7090141
 16. Mulyasuryani A., Prasetyawan S. Organophosphate hydrolase in conductometric biosensor for the detection of organophosphate pesticides. *Analytical Chemistry Insights*. 2015. V. 10. P. 23-27. doi:10.4137/aci.s30656
 17. Ruscito A., DeRosa M.C. Small-molecule binding aptamers: selection strategies, characterization, and applications. *Frontiers in Chemistry*. 2016. V. 4. Article. 14. doi:10.3389/fchem.2016.00014
 18. Syed M.A., Pervaiz S. Advances in aptamers // *Oligonucleotides*. 2010. V. 20(5). P. 215-224. doi:10.1089/oli.2010.0234
 19. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors Bioelectronics*. 2001. V. 16(1-2). P. 121-131. doi:10.1016/s0956-5663(01)00115-4
 20. Viswanathan S., Radecka H., Radecki J. Electrochemical biosensors for food analysis. *Monatshefte fuer Chemie. Chemical Monthly*. 2009. V. 140(8). P. 891-899. doi:10.1007/s00706-009-0143-5
 21. Yang X., Li N., Gorenstein D.G. Strategies for the discovery of therapeutic aptamers. *Expert*

- Opinion on Drug Discovery*. 2010. V. 6(1). P. 75-87.
doi:10.1517/17460441.2011.537321
22. Zhang W., Asiri A.M., Liu D., Du D., Lin Y. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014. V. 54. P. 1-10. doi:10.1016/j.trac.2013.10.007
23. Zhou J., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016. V. 16(3). P. 181-202. doi:10.1038/nrd.2016.199
24. Zhu X., Shi L. Nano-inspired biosensors for protein assay with clinical applications. *Electrochemistry*. 2019. P. 209-236. doi:10.1016/b978-0-12-815053-5.00009-x