

การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อคาร์บาริลและไซเปอร์เมทริน เพื่อการตรวจสอบปริมาณด้วยเทคนิค Electrochemical aptasensor

Selection of carbaryl and cypermethrin-specific DNA aptamers for quantitative detection using electrochemical aptasensor technique

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ^{1*} มัลลิกา ทองเขียว² อิทธิพล บั้วพรม² สุภาพร บั้วพรม² นาทยา จันทรสัจ²
กฤตยา เพชรณี³ และศิริวัลย์ สร้อยกล่อม³

Adcharapun Chaicharoen^{1*}, Malliga Thongkheaw², Ittipon Bongprom², Supapron Bongprom²,
Nattaya Jansong², Krittaya Petchpoung³ and Siriwan Soiklom³

-
- ¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี 12110
 - ² สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 กรมวิชาการเกษตร จังหวัดอุบลราชธานี 34190
 - ³ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

- ¹ Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani 12110
- ² Office of Agricultural and Development Region 4, Department of Agriculture, Ubon Ratchathani 34190
- ³ Scientific Equipment and Research Division, Kasetsart University Research and Development Institute, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Corresponding author: E-mail: adcharapun1826@gmail.com Tel : 089-7981826

Received: June 30, 2025;

Revised: October 6, 2025;

Accepted: October 16, 2025

การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน เพื่อการตรวจสอบปริมาณด้วยเทคนิค Electrochemical aptasensor

Selection of carbaryl and cypermethrin-specific DNA aptamers for quantitative detection using electrochemical aptasensor technique

บทคัดย่อ

การตรวจสอบสารตกค้างทางการเกษตรในผลผลิตเป็นขั้นตอนที่จำเป็นของกระบวนการผลิตอาหารปลอดภัย หากแต่การตรวจสอบมีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีต้นทุนสูง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงพัฒนาการตรวจสอบสารตกค้างทางการเกษตรอย่างง่ายและรวดเร็ว โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบด้วยเทคนิค Electrochemical aptasensor การวิจัยใช้สารมาตรฐานคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินเป็นแอปตาเจนในการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ด้วยวิธี systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) และวิธี indirect enzyme-linked aptamer assay (ELAA) พบว่า คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินได้ จำนวน 13 และ 22 เส้น ตามลำดับ นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาริล Car26 และไซเพอร์เมทริน Cyp126 ตรึงดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนอนุภาคทอง (Screen printed gold electrode; SPE gold) เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินในพืชผัก พบค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection: LOD) ของชุดตรวจสอบคาร์บาริลและไซเพอร์เมทริน มีค่าเท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 0.044 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การใช้ชุดตรวจสอบสารด้วย Electrochemical aptasensor มีต้นทุนที่ต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมี สามารถอ่านผลเป็นตัวเลขได้ ทำให้ชุดตรวจสอบนี้มีความสะดวกและง่ายในการใช้งาน

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์, คาร์บาริล, ไซเพอร์เมทริน, สารกำจัดศัตรูพืช, ไบโอสเซนเซอร์

Abstract

Testing for pesticide residue is a necessary step in the food safety production process. However, testing is complicated, time-consuming, and costly. Therefore, this research aimed to develop a simple and rapid method for pesticide residue detection. This study aimed to select DNA aptamers specific to carbaryl and cypermethrin for the development of an electrochemical aptasensor-based detection system. Carbaryl and cypermethrin standards were used as aptagen targets during aptamer selection via Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) and indirect enzyme-linked aptamer assay (ELAA). A total of 13 and 22 DNA aptamer strands binding to carbaryl and cypermethrin, respectively, were successfully isolated. Among these, the carbaryl-binding aptamer Car26 and cypermethrin-binding aptamer Cyp126 were immobilized onto screen-printed gold electrodes (SPE gold) to construct biosensors for detecting pesticide residues in vegetables. The developed aptasensors demonstrated low detection limits (LOD) of 0.049 ppm for carbaryl and 0.044 ppm for cypermethrin. Compared to conventional chemical analysis methods, this electrochemical aptasensor offers lower cost, digital quantitative output, and user-friendly operation, making it a practical tool for rapid on-site screening.

Keywords: DNA aptamer, Carbaryl, Cypermethrin, Pesticides, Biosensor

บทนำ (Introduction)

สารกำจัดแมลงศัตรูพืชนอกจากจะมีประโยชน์ต่อทางเกษตรกรรมแล้ว ในอีกแง่มุมหนึ่งก็จัดเป็นสารเคมีอันตรายที่มีผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชน ทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค หากสัมผัส สูดดม หรือรับประทานสารเหล่านี้เข้าสู่ร่างกาย โดยสารบางชนิดก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง พิษเฉียบพลันที่พบบ่อย ได้แก่ ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท และกล้ามเนื้อ เป็นต้น ส่วนพิษเรื้อรัง ได้แก่ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ก่อมะเร็ง และ ก่อให้เกิดความพิการแก่ทารก เป็นต้น ซึ่งสินค้าเกษตรที่วางขายตามท้องตลาด มักไม่มีร่องรอยของการถูกทำลายโดยโรคและแมลงศัตรูพืช แม้ผลผลิตทางการเกษตรจะมีลักษณะสวยงามปราศจากแมลง แต่ไม่ได้สะท้อนถึงความปลอดภัยจากสารตกค้าง อาจมีสารตกค้างจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและ โลหะหนัก การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา เป็นต้น

การตรวจสอบสารตกค้างทางการเกษตรในผลผลิตก่อนออกจากแปลงสู่แหล่งจำหน่าย เป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการผลิตอาหารปลอดภัย โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคทางเคมี ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารได้อย่างละเอียดและแม่นยำ อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดในด้านค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง และมีขั้นตอนการสกัดที่ซับซ้อน ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก แม้ปัจจุบันจะมีการพัฒนาชุดทดสอบสารพิษตกค้างภาคสนาม ที่อาศัยหลักการทางเคมีในการตรวจสอบ แต่ยังคงต้องอาศัยขั้นตอนและอุปกรณ์ที่ซับซ้อน ทำให้ไม่สะดวกต่อการใช้งานในระดับเกษตรกรหรือการตรวจสอบภาคสนามอย่างแท้จริง

ปัจจุบันมีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ อาจเป็น RNA, ssDNA หรือ dsDNA ที่เรียกว่า แอปตาเมอร์ (aptamer) มีคุณสมบัติมีแนวโน้มพับเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (tertiary structure) ซึ่งมีการทำงานคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ สามารถจับกับโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างจำเพาะและหลากหลายชนิด ซึ่งขั้นตอนแรกของการผลิตแอปตาเมอร์คือการออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวแบบสุ่ม (randomized sequence) ขนานขึ้นด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบลำดับเบส จำนวนชนิดของแอปตาเมอร์นั้นจะมีความหลากหลายมากเนื่องจากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มที่อยู่ตรงกลางลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อแอปตาเมอร์แต่ละเส้นเกิดการม้วนพับ จะเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะต่างๆ กัน ซึ่งคาดว่าจะมีความหลากหลายมากกว่า 10^{30} ชนิด จึงเสมือนเป็นคลังแอปตาเมอร์ (aptamer library) โครงสร้างทุติยภูมิของแอปตาเมอร์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเข้าจับโมเลกุลได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Michaud et al., 2003)

หนึ่งในการคัดเลือกแอปตาเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโมเลกุลที่ต้องการจากคลังแอปตาเมอร์คือเทคนิค systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) (Tuerk & Gold, 1990) ซึ่งมีเพียง 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ 1. นำคลังแอปตาเมอร์จับกับโมเลกุลเป้าหมาย 2. คัดแยกแอปตาเมอร์ที่จับกับโมเลกุลเป้าหมาย และ 3. เพิ่มปริมาณแอปตาเมอร์ที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การคัดเลือกแอปตาเมอร์ด้วยวิธี SELEX ส่วนใหญ่จะคัดเลือกประมาณ 5-15 รอบ

เทคโนโลยีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่นำมาใช้ในการตรวจหาสารตกค้างทางการเกษตร สามารถนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารตกค้างทางการเกษตรอย่างง่ายได้เกษตรกรและเจ้าหน้าที่ภาคสนามยังสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยตัวเองและทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งมีรายงานถึงความสำเร็จของการใช้แอปตาเมอร์ตรวจสอบสารกำจัดแมลงศัตรูพืชในน้ำและอาหาร (Wang et al., 2012; Liu et al., 2019; Phopin & Tantimongkolwat, 2020) รวมถึงรายงานการใช้แอปตาเมอร์ตรวจหาแคดเมียมที่ปนเปื้อน ในน้ำดื่มและสิ่งแวดล้อม (Wu et al., 2014; Zhu et al., 2017) และการตรวจหาตะกั่วในน้ำดื่ม (Shahdordizadeh et al., 2018; Abu-Ali et al., 2019) โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และพัฒนาเทคนิค Electrochemical aptasensor สำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชชนิดคาร์บาไรลและไซเพอร์เมทรีนในสารสกัดจากพืชผัก

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ (Material and Methodology)

1. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตามอร์ที่จับสารคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทริน

1.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตามอร์ (DNA aptamer library)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA aptamer) ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-(N₄₀)-TCGGATCCGCTATAGTGAGTCGTATTA-3' (BIONICS, South Korean) ซึ่งประกอบ ด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ (N₄₀) อยู่บริเวณกลางของ DNA aptamer ส่วนบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ โดยวิธี PCR ดังนี้ forward primer (AptF), 5'-TTTCTGCAGGTCGACTAATACGACTCACTATAGCGGA-3'; reverse primer (AptR), 5'-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' เมอร์ และสังเคราะห์ไพรเมอร์ AptR-Biotin [(biotin)-5-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3] สำหรับติด biotin ที่ปลาย 5' ของ DNA aptamer

1.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตามอร์ที่จับสารคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทริน ด้วยวิธี SELEX

คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตามอร์ที่จับกับสารมาตรฐานคาร์บาริล (carbaryl) และ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) จากคลัง ดีเอ็นเอแอปตามอร์ ด้วยวิธีคัดแปลง SELEX ของ Hall et al. (2009) จำนวน 15 รอบ โดยนำคลังดีเอ็นเอแอปตามอร์ 1 นาโนโมลาร์ มาละลายใน Phosphate buffered saline (PBS: Sigma, USA) ที่เติม Tween-20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (PBST) ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที จากนั้น เติมสารมาตรฐานคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทริน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายลงคอลัมน์ Vivaspin 500 (GE Healthcare, Sweden) ที่มี Molecular Weight Cut Off (MWCO) 30 กิโลดาลตัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย PBST ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเช่นเดิม เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ละลาย aptamer-carbaryl/cypermethrin complex ออกจากคอลัมน์ ด้วย PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ aptamer-carbaryl/cypermethrin complex ไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และไพรเมอร์ AptF และ AptR มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 15 รอบของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำผลผลิตจาก PCR ทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยคัดแปลงจากวิธีการของ Barthelmebe et al. (2011) โดยใช้สารมาตรฐานคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทริน เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA เปรียบเทียบกับบัพเฟอร์ จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอ แอปตามอร์ที่จับกับสารมาตรฐานคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทริน และติดฉลากด้วยหมู่ SH ด้านปลาย 5' เพื่อนำไปเคลือบลงบนแผ่นขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนอนุภาคทอง (SPE gold)

2. การพัฒนาชุดตรวจสอบคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทรินด้วยเทคนิค Electrochemical aptasensor

2.1 การสกัดตัวอย่างพืชผัก กลุ่ม High water and chlorophyll content

วิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส โดยใช้กะน้าเป็นพืชตัวแทน กลุ่ม High water and chlorophyll content ด้วยการวิเคราะห์สารพิษตกค้างแบบรวม ด้วยวิธี QuEChERS ตามวิธีของ BSI (2018) โดยล้างตัวอย่างกะน้าให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ทั้งต้นและใบโดยใช้มีด จากนั้น นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ปั่นแล้ว ชั่ง 10 กรัม ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที เติม magnesium sulfate (MgSO₄) จำนวน 4.0 กรัม sodium chloride (NaCl)

จำนวน 1.0 กรัม trisodium citrate dihydrate ($C_6H_6Na_2O_7$) จำนวน 1.0 กรัม และ sodium citrate dibasic sesquihydrate ($C_6H_6Na_2O_7$) จำนวน 0.5 กรัม แล้วปิดฝา เขย่าแรงๆ ด้วยมือทันที ตามด้วยเขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ $\geq 3,500$ รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดสารละลายตัวอย่างส่วนบน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งเป็น Dispersive-SPE clean-up ที่บรรจุ magnesium sulfate ($MgSO_4$) ประมาณ 0.9 กรัม และ PSA ประมาณ 0.15 กรัม ปิดฝาให้สนิท แล้วเขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ $\geq 3,500$ รอบต่อนาที นาน 3 นาที กรองสารผ่าน syringe filter (PTFE/Nylon) ขนาด 0.2/0.45 ไมโครเมตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเครื่อง Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100 (Zensor, Taiwan)

2.2 การยัดดีเอ็นเอแอปตามอร์ต่อสารคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทรินบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนทอง (Screen printed gold electrode; SPE Gold) ตามวิธีดัดแปลงของ Naghshbandi et al. (2022)

ล้างขั้วไฟฟ้า SPE Gold ด้วยเครื่องล้างแผ่นขั้วไฟฟ้าชนิด Atomspheric Pressure Plasma (Creating Nano Technologies, Taiwan) โดยใช้ความเร็วในการสแกน 30 มิลลิเมตรต่อวินาที และ ระยะห่าง 6 มิลลิเมตร จากนั้น หยดดีเอ็นเอแอปตามอร์ที่จำเพาะต่อคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทรินซึ่งพ่วงด้วยสารกลุ่ม Thiol (SH) ทางด้านปลาย 5' ของเส้นดีเอ็นเอแอปตามอร์ ความเข้มข้น 4 ไมโครโมล ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้า SPE Gold ปลอ่ยให้แห้ง ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน จากนั้น หยด BlockPRO™ 1 Min Protein-Free Blocking Buffer (visual protein, Taiwan) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้า บ่มนาน 5 นาที และล้างขั้วไฟฟ้าด้วย เก็บขั้วไฟฟ้า SPE Gold ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอแอปตามอร์ต่อคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทรินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตามอร์ที่จับกับคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทริน

ใช้ดีเอ็นเอแอปตามอร์ต่อคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทรินที่พ่วงด้วย ชนิดละ 3 เส้น ได้แก่ Car4, Car10, Car26, Cyp49, Cyp71 และ Cyp126เคลือบลงบนขั้วไฟฟ้า SPE Gold นำสารมาตรฐานคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทริน ที่เจือจางใน binding buffer (1 mM $MgCl_2$, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1 mM Na_2HPO_4 and 1.8 mM, KH_2PO_4 pH 7.4) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดลงบนขั้วไฟฟ้า SPE Gold ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอแอปตามอร์แต่ละเส้น จากนั้นวัดค่าสเปกตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) ด้วยเครื่อง Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100 (Zensor, Taiwan)

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตามอร์

สารสกัดพืชผักที่ได้จากข้อ 2.1 ละลายด้วย acetonitrile ซึ่งส่งผลต่อการจับสารเป้าหมายของดีเอ็นเอแอปตามอร์ ที่เคลือบอยู่บนขั้วไฟฟ้า จึงใช้น้ำกลั่นเจือจางสารสกัดจากพืชผัก ในอัตรา 1:2 และ 1:4 ที่เดิม สารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดลงบนขั้วไฟฟ้า SPE Gold ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอแอปตามอร์ บ่มนาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ซับให้แห้ง แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100 (Zensor, Taiwan) จากนั้นวัดค่าสเปกตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS)

2.5 การหาช่วงความเป็นเส้นตรง และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดและวิเคราะห์ปริมาณได้ ในการตรวจสอบคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทรินในสารสกัดพืชผัก

เติมสารมาตรฐานคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทรินให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารสกัดจากพืชผักที่เจือจางในน้ำกลั่น อัตรา 1:4 หยดลงบนแผ่นขั้วไฟฟ้าเคลือบด้วยดีเอ็นเอแอปตามอร์ต่อคาร์บาร์ล/ไซเพอร์เมทริน บ่มนาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ซับให้แห้ง

แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญทางการเกษตรภาคสนาม (Zensor Simulator AC Impedance รุ่น ACIP100) จากนั้น วิเคราะห์ปริมาณคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทริน ด้วยการวัดค่า EIS นำค่า EIS ที่ได้วิเคราะห์ได้ สร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณหาช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection: LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantitative: LOQ)

การประเมินค่า LOD และค่า LOQ ใช้สมการจากรายงานของ Ellison and Williams (2012) ดังนี้

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times \sigma}{b} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{b}$$

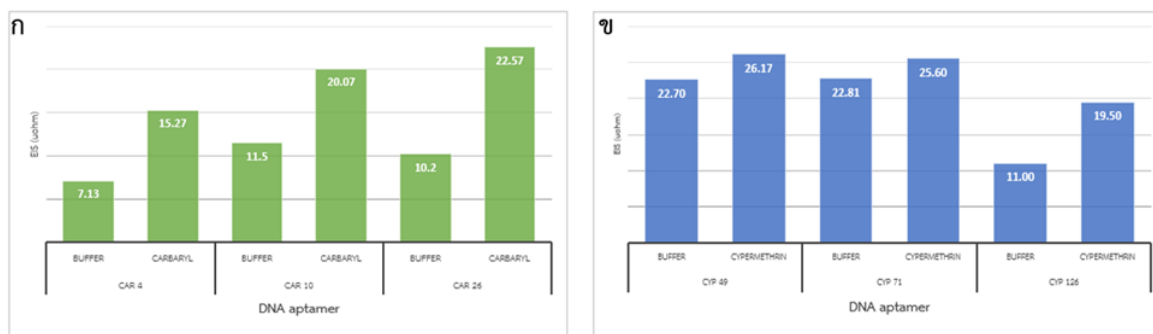
เมื่อ σ คือ ค่า residual standard deviation ของสัญญาณการตอบสนอง

b คือ ความชันของเส้นสอบเทียบ ซึ่งสะท้อนความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณรบกวนและความไวของเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์

ผลและอภิปราย (Result and Discussion)

1. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับสารคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทริน

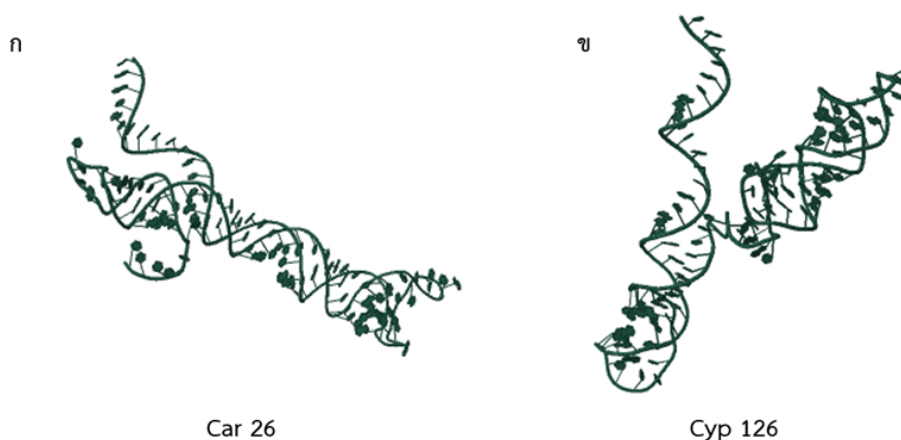
คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทริน ด้วยเทคนิค SELEX และวิธี indirect ELAA พบว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกสามารถจับกับสารมาตรฐานคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทริน ได้ จึงเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทริน ที่มีค่า S/N ration มากกว่า 2 จำนวน 6 เส้น ได้แก่ ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อคาร์บาร์ลิต Car4, Car10, Car26 และดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อไซเพอร์เมทริน Cyp49, Cyp71 และ Cyp126 จากนั้น นำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แต่ละเส้น ตรึงบนขั้วไฟฟ้า SPE Gold เพื่อวิเคราะห์การจับกับคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทริน โดยเปรียบเทียบกับบัพเฟอร์ที่ใช้ละลายสารมาตรฐาน หากค่า EIS ของการตรวจจับคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทริน เพิ่มขึ้นจากค่า EIS ของบัพเฟอร์ นั้นแสดงว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้าสามารถจับกับคาร์บาร์ลิต/ไซเพอร์เมทรินได้ จากการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาร์ลิต Car4, Car10 และ Car26 มีค่าสัญญาณ EIS ของการตรวจจับคาร์บาร์ลิต/บัพเฟอร์ เท่ากับ 15.27/7.13, 20.07/11.50 และ 22.57/10.20 ไมโครโอห์ม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าสัญญาณ EIS ของบัพเฟอร์ทุกเส้น (ภาพที่ 1ก) ส่วนดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อไซเพอร์เมทริน Cyp49, Cyp71 และ Cyp126 มีค่า EIS ของการตรวจจับไซเพอร์เมทริน/บัพเฟอร์ เท่ากับ 26.17/22.70, 25.60/22.81 และ 19.50/11.00 ไมโครโอห์ม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าสัญญาณ EIS ของบัพเฟอร์ทุกเส้นเช่นกัน (ภาพที่ 1ข) จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทุกเส้น เมื่อตรึงบนขั้วไฟฟ้า ยังคงความสามารถในการจับกับสารเป้าหมายได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาร์ลิต Car26 และ ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับไซเพอร์เมทริน Cyp126 ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบส จากปลาย 5' ไปปลาย 3' ดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์หาโครงสร้างสามมิติ (ภาพที่ 2) พบว่า โครงสร้างที่ได้สามารถม้วนพับ ทบซ้อนทำให้เกิด loop และ hairpin ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีส่วนสำคัญในการจับกับสารเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Ellington & Szostak, 1992)



ภาพที่ 1 ค่าสเปกตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy: EIS) ของการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ Car4 Car10 และ Car26 และสารมาตรฐานคาร์บาริล (ก) และดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ Cyp49 Cyp71 และ Cyp126 และสารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน (ข)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อสารคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทริน

แอปตาเมอร์	ลำดับเบส (5'- 3')
Car26	TAATACGACTCACTATAGCGGATCCGAGTAGGTTGGGGAAATTACATTCCATCCCTT AAACACTCACCTGGCTCGAACAAGCTTGCAAGCTTGAATTCTTT
Cyp126	TAATACGACTCACTATAGCGGATCCGACAAAACCTCAATGAACGATCTTCCTTCCAAGTC AAGTT AGCTGGCTCGAACAAGCTTGCAAGCTTGAATTCTTT

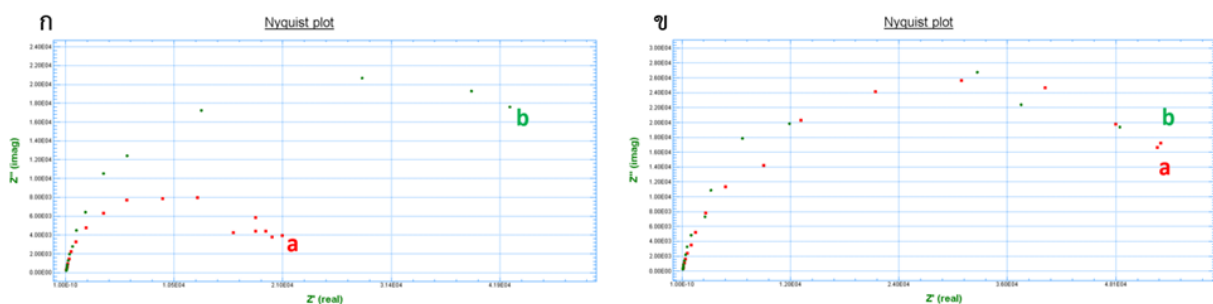


ภาพที่ 2 โครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับคาร์บาริล Car26 (ก) และ ไซเพอร์เมทริน Cyp126 (ข) วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RNAComposer

2. การพัฒนาชุดตรวจสอบคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทรินด้วยเทคนิค Electrochemical aptasensor

เทคนิค electrochemical aptasensor เป็นเทคนิคที่นำหลักการของเคมีไฟฟ้ามาใช้ในการวัดระดับของสัญญาณไฟฟ้าที่เกิดจากการจับกันระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเมอร์กับเป้าหมาย ดังนั้นสารสกัดพืชผักที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช ละลายด้วย acetonitrile ซึ่งเมื่อหยดลงบนขั้วไฟฟ้าที่มีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์เคลือบอยู่ จะส่งผลโดยตรงต่อการจับของแอปตาเมอร์ ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงใช้น้ำกลั่นเจือจางสารสกัดพืชผักที่มีไซเพอร์เมทรินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 1:2 และ 1:4 พบว่า ค่า EIS ของสารสกัดจากพืชผักที่เจือจางด้วยน้ำ 1:2 มีค่าต่ำกว่าสารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 3ก) สะท้อนให้เห็นว่า การมี acetonitrile เข้มข้นใน

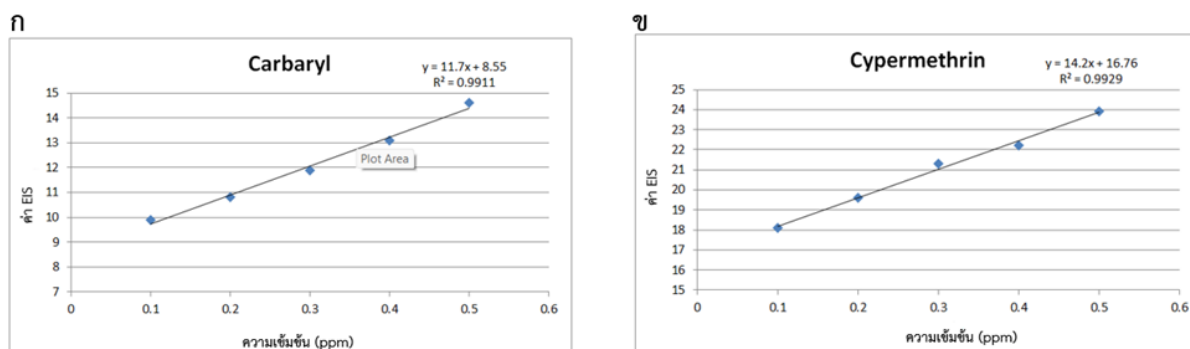
สารสกัดอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ และโมเลกุลเป้าหมาย (target molecule) บนพื้นผิวขั้วไฟฟ้า ในขณะที่ค่า EIS ของสารสกัดจากพืชผักที่เจือจางด้วยน้ำ 1:4 มีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐานไซเพอร์เมทริน เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับเดียวกัน (ภาพที่ 3ข) แสดงให้เห็นว่าการลดความเข้มข้นของ acetonitrile ช่วยลดผลกระทบของตัวทำละลายต่อโครงสร้างของแอปตาเมอร์และการเกิดพันธะจำเพาะกับไซเพอร์เมทริน ได้อย่างมีนัยสำคัญ acetonitrile เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง ซึ่งมักถูกใช้ในการสกัดสารกำจัดศัตรูพืชจากพืชผัก (QuEChERS extraction method) ซึ่งความเข้มข้นของ acetonitrile สูงเกินไปอาจรบกวนการพับตัว (folding) ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และลดความเสถียรของโครงสร้างรอง (secondary structure) เช่น G-quadruplex หรือ hairpin loop ที่จำเป็นต่อการจับเป้าหมายอย่างจำเพาะ (Song et al., 2012) ส่งผลให้ค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าลดลง การเจือจางด้วยน้ำในอัตรา 1 : 4 จึงมีบทบาทสำคัญในการลดปริมาณ acetonitrile ที่อาจทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ และยังคงสภาพสมดุลของสภาพแวดล้อมทางไฟฟ้าเคมี ให้เหมาะสมต่อการถ่ายโอนประจุระหว่างพื้นผิวขั้วไฟฟ้าและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ลดผลกระทบจากเมทริกซ์ของพืชผัก (matrix effect) ซึ่งมักประกอบด้วยสารอินทรีย์ เช่น ฟีนอลิก หรือคลอโรฟิลล์ ที่อาจแทรกแซงสัญญาณการวัด นอกจากนี้ รายงานของ Zhou et al. (2019) พบว่า การมีอยู่ของตัวทำละลายอินทรีย์เช่น methanol หรือ acetonitrile มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในระบบวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrochemical aptasensor จะทำให้สัญญาณไฟฟ้าลดลงชัดเจน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอปตาเมอร์และการรบกวนการเกิด electric double layer บนผิวอิเล็กโทรด ดังนั้น การเลือกใช้อัตราการเจือจางสารสกัดจากพืชผักด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:4 จึงถือเป็นการปรับสมดุลระหว่างการคงความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืชให้อยู่ในช่วงที่ตรวจวัดได้ และการลดผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อการทำงานของแอปตาเมอร์ ซึ่งสอดคล้องกับหลักการออกแบบระบบตรวจวัดด้วยแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าที่มุ่งให้เกิดสัญญาณตอบสนองจำเพาะและมีความเที่ยงตรงสูง (Liu et al., 2021)



ภาพที่ 3 แผนภาพไนควิสต์ (Nyquist plot) ของการวิเคราะห์ ก) ไซเพอร์เมทรินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในสารสกัดจากพืชผักเจือจางด้วยน้ำ 1:2 (a) เปรียบเทียบกับไซเพอร์เมทรินเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (b) ข) ไซเพอร์เมทรินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารสกัดจากพืชผักเจือจางด้วยน้ำ 1:4 (a) เปรียบเทียบกับไซเพอร์เมทรินเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (b)

การสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์คาร์บาร์ลิด/ไซเพอร์เมทริน ใช้สารสกัดจากพืชผักเป็นแมทริกซ์ โดยเติมสารมาตรฐานคาร์บาร์ลิด/ไซเพอร์เมทรินให้มีความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าค่า EIS ของคาร์บาร์ลิด/ไซเพอร์เมทริน มีค่าเพิ่มขึ้นตามค่าความเข้มข้นของคาร์บาร์ลิด/ไซเพอร์เมทริน โดย มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปจนถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของคาร์บาร์ลิด/ไซเพอร์เมทรินและค่า EIS ซึ่งมีลักษณะแบบเชิงเส้น ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) = 0.9911 และ 0.9929 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงตรงของระบบเซนเซอร์และความสามารถในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นสารกำจัดศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) จากผลการคำนวณ พบว่าค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์คาร์บาริล เท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.149 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ ค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์ไซเพอร์เมทริน เท่ากับ 0.044 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.133 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น พบว่าค่า LOD ที่ได้จากงานนี้อยู่ในระดับ มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแม้จะสูงกว่าค่าที่รายงานโดย Liu et al. (2021) ที่ใช้ fluorescent aptasensor สำหรับการตรวจคาร์บาริลในน้ำและดิน ซึ่งมี LOD ต่ำเพียง 15.23 นาโนโมลต่อลิตร (ประมาณ 0.0035 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ผลการทดลองในงานวิจัยนี้ใช้สารสกัดจากพืชผัก ซึ่งเป็นเมทริกซ์จริง ทำให้เกิดการรบกวนต่อสัญญาณการวัด จึงส่งผลให้ค่า LOD สูงกว่าการวิเคราะห์ในสารละลายมาตรฐานบริสุทธิ์ ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทางเคมีมาตรฐาน เช่น HPLC หรือ GC-MS ซึ่งโดยทั่วไปสามารถให้ค่า LOD ในระดับ ไมโครกรัมต่อลิตร (Sindhu & Manickavasagan, 2023) ถึงแม้ว่า ค่า LOD ของเทคนิค electrochemical aptasensor ที่พัฒนาขึ้นนี้ ยังมีความไวต่ำกว่า แต่มีข้อได้เปรียบสำคัญในด้าน ความสะดวก รวดเร็ว และต้นทุนการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่าอย่างมาก ทั้งในส่วนของเครื่องมือ สารเคมี และเวลาในการเตรียมตัวอย่าง (Phopin & Tantimongcolwat, 2020)



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์คาร์บาริล (ก) และไซเพอร์เมทริน (ข) ในสารสกัดจากพืชผัก

สรุปผล (Conclusion)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิค Electrochemical aptasensor สำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชชนิดคาร์บาริลและไซเพอร์เมทรินในสารสกัดจากพืชผัก โดยใช้ดีเอ็นเอแอปตามอร์ car26 สำหรับคาร์บาริล และดีเอ็นเอแอปตามอร์ cyp126 สำหรับไซเพอร์เมทริน ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ ใช้ตรวจสอบปริมาณสารคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทรินในสารสกัดพืชผัก โดยใช้สารสกัดพืชผักที่เจือจางด้วยน้ำ 1 : 4 เพื่อลดผลกระทบของตัวทำลายต่อการจับของแอปตามอร์บนขั้วไฟฟ้า ตรวจวัดด้วยเทคนิค Electrochemical aptasensor สามารถตรวจวัดสัญญาณความเข้มข้นของคาร์บาริล/ไซเพอร์เมทรินได้ เป็นเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) สูงกว่า 0.99 ค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์คาร์บาริล มีค่าเท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.149 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนไซเพอร์เมทรินมีค่า LOD เท่ากับ 0.044 มิลลิกรัมต่อลิตร และ LOQ เท่ากับ 0.133 มิลลิกรัมต่อลิตร

เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดีคือ ใช้งานง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีต้นทุนการวิเคราะห์ต่ำ เมื่อเทียบกับวิธีการทางเคมีมาตรฐาน อีกทั้งสามารถให้ผลการตรวจวัดเชิงปริมาณได้โดยตรงจึงมีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือคัดกรองสารตกค้างทางการเกษตรในภาคสนาม เพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยของอาหารและสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว)

เอกสารอ้างอิง (Reference)

- Abu-Ali, H., Nabok A., and Smith, T.J. (2019). Development of Novel and Highly Specific ssDNA-Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of Mercury (II) and Lead (II) Ions in Water. *Chemosensors*. 7(2), 27.
- Barthelmebe, L., Jonca, J., HayatA., Simon, B.P., and Marty, J.L. (2011). Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control*. 22,737-743.
- British Standards Institution (BSI). (2018). Foods of plant origin. Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. Modular QuEChERS-method. 84 pp.
- Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*. 355(6363), 850-852.
- Hall, B., Arshad, S., Seo, K., Bowman, C., Corley, M., Jhaveri, S.D., and Ellington, A.D. (2009). In vitro selection of RNA aptamers to a protein target by filter immobilization. *Current Protocols in Molecular Biology*. 24(3),1-27.
- Liu, M., Arshad, K., Zhifei, W., Yuan, L., Gaojian, Y., Yan, D., and Nongyue, H. (2019). Aptasensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 130, 174-184.
- Liu, Y., Yang, G., Li, T., Deng, Y., Chen, Z., and He, N. (2021). Selection of a DNA aptamer for the development of fluorescent aptasensor for carbaryl detection. *Chinese Chemical Letters*. 32(6), 1957–1962.
- Michaud, M., Jourdan, E., Villet,A., Ravel, A., Grosset, C., and Peyrin, E. (2003). A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *Journal of the American Chemical Society*. 125 (28), 8672–8679.
- Naghshbandi, B., Adabi, M., Pooshang Bagheri, K., and Tavakolipour, H. (2022). Design of a new electrochemical aptasensor based on screen printed carbon electrode modified with gold nanoparticles for the detection of fumonisin B1 in maize flour. *Nanobiotechnology*. 20, 534.
- Phopin, K., and Tantimongcolwat, T. (2020). Pesticide Aptasensors—State of the Art and Perspectives. *Sensors*. 20(23), 6809.
- Shahdordizadeh, M., Yazdian-Robati, R., Ansari, N., Ramezani, M., Abnous, K., and Taghdisi S. M. (2018). An aptamer-based colorimetric lead (II) assay based on the use of gold nanoparticles modified with dsDNA and exonuclease I. *Microchimica Acta*. 185(2).
- Sindhu, S., and Manickavasagan, A. (2023). Nondestructive Testing Methods for Pesticide Residue in Food Commodities: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 22, 1226–1256.
- Song, K.M., Lee, S., and Ban, C. (2012). Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors*. 12(12), 612–631.

- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 249(4968), 505-510.
- Wang, L., Liu, X., Zhang, Q., Zhang, C., Liu, Y., Tu, K., and Tu, J.(2012). Selection of DNA aptamers that bind to four organophosphorus pesticides. *Biotechnology letters*. 34(5), 869-74.
- Wu, Y., Zhan, S., Wang, L., and Zhou, P. (2014). Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles. *The Analyst*. 139(6), 1550–1561.
- Zhou, L., Li, D., Hu, J., and Wang, H. (2019). Effect of organic solvents on electrochemical aptamer sensors for pesticide detection. *Electrochimica Acta*. 296, 221–229.
- Zhu, Y.F., Wang, Y.S., Zhou, B., Yu, J.H., Peng, L.L., Huang, Y.Q., and Wang, X.F. (2017). A multifunctional fluorescent aptamer probe for highly sensitive and selective detection of cadmium (II). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 409(21), 4951–4958.