

УДК 543.08+543.55

© П. К. Афоничева, Н. В. Ваулин, Д. В. Лебедев, А. С. Букатин,
Д. А. Кириленко, А. Н. Аблеев, Ю. Д. Иванов, И. С. Мухин, А. А. Евстрапов, 2024

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК С ПОМОЩЬЮ ТВЕРДОТЕЛЬНОЙ НАНОПОРЫ

В работе продемонстрирована возможность электрохимического детектирования одиночных молекул ДНК с помощью тонкой SiN-мембраны с интегрированной наноразмерной порой. Были проведены эксперименты по регистрации ионного тока для буферного раствора без/с добавлением молекул ДНК 10 000, 5000 и 500 пар оснований (п.о.). Для анализа полученных данных разработан алгоритм поиска событий транслокаций одиночных молекул через нанопору. Такой алгоритм позволяет анализировать амплитуду, длительность и частоту обнаруженных событий с целью анализа детектируемых молекул. Для ДНК 5000 и 500 п.о. показана нелинейная зависимость продолжительности прохождения молекул от их длины. Продemonстрировано, что при уменьшении длины молекул в 10 раз продолжительность транслокаций снижается на 35%. Продemonстрированная возможность детектирования транслокаций создает основу для создания твердотельного нанопорового сенсора.

Кл. сл.: нанопора, твердотельная нанопора, микрофлюидика, ионный транспорт, SiN-мембраны, биосенсоры, ДНК, транслокация ДНК

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается повышенный интерес к междисциплинарным исследованиям, направленным на разработку новых устройств с интегрированными микро- и наноструктурами для биомедицинских приложений [1]. Для реализации подобных устройств применяется сочетание методов микро- и нанофлюидики с технологиями микроэлектроники, что позволяет создавать высокочувствительные сенсоры [2], принцип действия которых основан на взаимодействии исследуемого объекта с твердотельными наноразмерными структурами. Одним из наиболее перспективных направлений развития такого подхода является формирование наноразмерных отверстий (нанопор) в тонких, непроницаемых мембранах [3]. Изготовление нанопор с характерными величинами диаметра/длины от 1 до 100 нм открывает широкий спектр возможностей для их применения в биомедицине: концентрации и выделения нуклеиновых кислот (НК) [4, 5], анализа и детектирования одиночных биомолекул [6], секвенирования НК [7, 8].

Наиболее распространенный принцип нанопорового детектирования заключается в регистрации ионного тока, протекающего через нанопору под действием внешнего электрического поля [9]. Детектирование происходит в измерительной электрохимической ячейке, представляющей собой

независимые (cis и trans) объемы, между которыми фиксируется тонкая мембрана с интегрированной нанопорой. Приложенное электрическое поле формирует направленный транспорт исследуемых молекул из cis-объема в trans-объем через внутренний объем нанопоры. Процесс перемещения молекул через нанопору (событие транслокации) сопровождается скачкообразным изменением (модуляцией) уровня регистрируемого ионного тока. Амплитуда и форма события транслокации зависят от формы и размеров детектируемой молекулы, а также от ее жесткости, заряда и конформационных свойств [10].

Прямыми конкурентами твердотельных нанопор применительно к секвенированию являются биологические нанопоры [11], представляющие собой искусственно синтезированные транспортные белки (α -HL, AeL, ClyA) [12], интегрированные в липидные мембраны. Несмотря на то, что биологические поры активно применяются для секвенирования ДНК [13] и исследования трансмембранного транспорта биологических молекул, они обладают рядом существенных недостатков, такими как ограниченный срок службы и строгие требования к условиям эксплуатации, хранения (температура, концентрация электролита и pH) [9], что значительно сужает возможности их применения. В свою очередь твердотельные нанопоры и наноканалы являются перспективным аналогом, поскольку обладают хорошей механической, тер-

мической и химической стабильностью [14, 15], широкими возможностями по модификации их сенсорных и селективных свойств [16], а также хорошим технологическим потенциалом для серийного производства.

Несмотря на ряд преимуществ, твердотельные нанопоры еще не продемонстрировали сенсорные свойства, необходимые для секвенирования ДНК. Основным препятствием этому выступают высокая скорость транслокации молекул в сочетании со сложным механизмом взаимодействия между молекулой ДНК (содержащей как гидрофобные основания, так и гидрофильную основную цепь) и поверхностью поры. Эти эффекты приводят к регистрации коротких сигналов с низким соотношением сигнал/шум, что не позволяет реализовать эффективную идентификацию отдельных нуклеотидов в ДНК. Разработка твердотельных нанопоровых датчиков, способных полностью охарактеризовать детектируемые биомолекулы, является сложной задачей из-за высокой скорости электрофоретической транслокации [17], вызванной сильной локализацией электрического поля в области поры. Сильные поля обусловлены наноразмерами структуры и являются необходимым фактором для формирования уровня тока, превышающего тепловой шум, в то время как для преодоления барьеров, определяемых конформационной энтропией, электростатическим отталкиванием и электроосмотическим потоком, требуется приложить напряжение смещения порядка не менее 20–60 мВ [18].

Типичные скорости транслокации НК через твердотельные нанопоры составляют 1 основание в 10–1000 нс [19]. При таких высоких скоростях короткие фрагменты нуклеиновых кислот (< 100 пар оснований, п.о.) часто невозможно обнаружить. Таким образом, для регистрации сигнала необходима широкая полоса пропускания сигнала (> 1 МГц), что в свою очередь приводит к увеличению уровня тепловых шумов и затрудняет детектирование. Часто для снижения скорости транслокаций применяются дополнительные механизмы, такие как изменение вязкости электролита [20], использование оптического пинцета или плазмонных структур [21].

Помимо оптимизации условий эксперимента и методов детектирования решающее значение имеет обработка полученных сигналов и определение события транслокации. Большинство существующих методов обнаружения событий представляют собой идентификацию скачкообразных изменений уровня ионного тока. Изменения тока вычисляются/ранжируются и отсекаются при достижении определенного порогового значения (триггер). Такие методы поиска событий можно разделить на две категории: классический подход

определения пользователем порогового значения с помощью таких программ, как MiniAnalysis [22], Easy Electrophysiology [23] и Clampfit [24], и более продвинутые методы, использующие адаптивные или локальные пороги, исходя из полученных данных, предполагая, что базовый ток стабилен во времени, реализованные в программах OpenNanopore [25], MOSAIC [26], Transalyzer [27], EasyNanopore [28].

Данная работа посвящена исследованию возможности детектирования одиночных молекул ДНК различной длины с помощью наноразмерной SiN-поры, а также статистическому анализу событий транслокаций с целью изучения механизмов прохождения молекул ДНК через внутренний объем нанопоры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы, представляющие собой свободно подвешенную SiN-мембрану толщиной 40 нм с одиночной нанопорой диаметром ~5 нм. На первом этапе синтеза структуры слой SiN толщиной 40 нм формировался на отожженной Si-подложке методом химического осаждения из газовой фазы при пониженном давлении (LP-CVD). Далее с использованием методов плазмохимического и анизотропного травления Si-подложка удалялась, формируя свободно подвешенную SiN-мембрану площадью ~900 мкм².

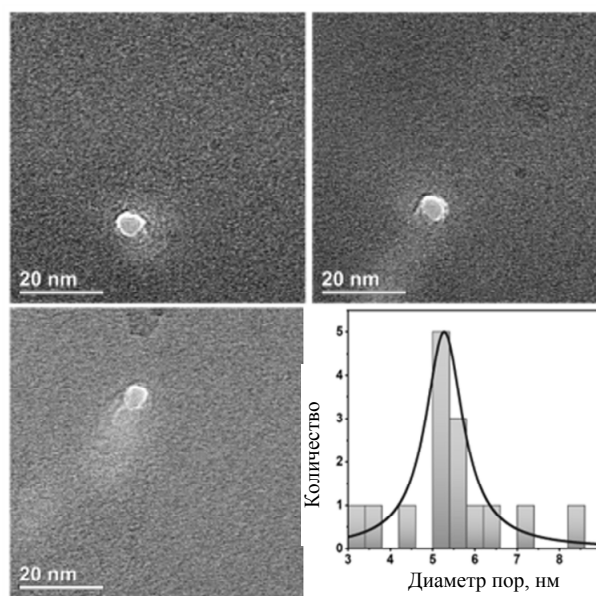


Рис. 1. ПЭМ-изображения трех SiN-нанопор длиной 40 нм и диаметром ~5 нм и распределение диаметров формируемых нанопор по размерам

Формирование нанопор в полученной мембране происходило методом травления сфокусированным электронным пучком с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ). Данный метод позволяет формировать твердотельные нанопоры необходимых размеров с хорошей воспроизводимостью (рис. 1).

В экспериментах по детектированию молекул ДНК использовалась разработанная нами измерительная ячейка, представляющая собой два независимых *cis*- и *trans*-объема, формируемые методом фотополимерной 3D-печати. В ячейку устанавливались Ag/AgCl электроды для проведения измерений по двухэлектродной схеме, а также система капилляров для подачи/отвода буферного раствора электролита. Мембрана с интегрированной нанопорой герметично фиксировалась в ячейке с помощью эластичных прокладок, соединяя *cis*- и *trans*-объемы. В процессе заполнения буферным раствором измерительная ячейка проходила процедуру дегазации для предотвращения образования микропузырей воздуха вблизи нанопоры. Методика заполнения ячейки была отработана и подробно описана в предыдущих работах [29].

В качестве буферного электролита использовался раствор 0.1 М KCl и 1X PBS (1:1), pH = 7.4. Измерения ионного тока проводились с помощью источника-измерителя напряжения и тока, позволяющего проводить измерения с частотой 50 кГц. Исследуемыми молекулами в экспериментах выступали двухцепочечные ДНК разной длины: 10 000 п.о., 5000 п.о. и 500 п.о. (ЗАО "СИНТОЛ").

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе была исследована возможность нанопорового детектирования молекул ДНК 10 000 п.о. Для этого был проведен эксперимент, направленный на обнаружение транслокаций после добавления молекул ДНК в чистый буферный раствор. Сначала была проанализирована стабильность ионного тока в чистом буферном растворе до добавления ДНК. Измерения тока осуществлялись в потенциостатическом режиме (приложенная разность потенциалов фиксирована во времени). На полученной потенциостатической кривой зависимости тока от времени наблюдался уровень тока 244.9 пА при среднеквадратичном отклонении (СКО) 10.6 пА ($U = 0.1$ В), что говорит о высокой чистоте раствора, обеспечивающей отсутствие паразитных событий транслокаций. Далее, в объем ячейки, включающий в себя отрицательно заряженный электрод (*cis*-объем см. рис. 2), был добавлен буферный раствор, содержащий молекулы ДНК длиной 10 000 п.о. в концентрации ~0.1 нг/мкл. Под действием приложенного элек-

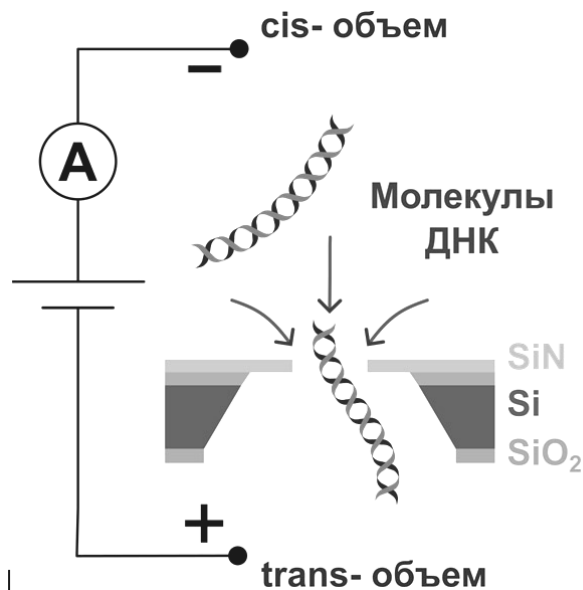


Рис. 2. Схема эксперимента по детектированию одиночных молекул ДНК

трического поля отрицательно заряженные молекулы ДНК перемещались через нанопору из *cis*- в *trans*-объем (рис. 2). При этом средний уровень ионного тока составил 218.3 пА, при СКО 7.5 пА. После чего были зарегистрированы короткие скачкообразные изменения уровня ионного тока (события транслокаций), что говорит о возникновении транспорта молекул ДНК через внутренний объем нанопоры.

Вторым этапом работы стало исследование зависимости продолжительности событий транслокаций от длины молекул ДНК. Эксперимент был проведен аналогично первому этапу для молекул ДНК длиной 5000 и 500 п.о. в концентрациях 1.25 нг/мкл и 3.3 нг/мкл соответственно. Для увеличения отношения сигнал/шум в данном эксперименте было приложено напряжение 0.3 В. Для обеспечения чистоты эксперимента измерения были проведены на другом образце SiN-нанопоры диаметром ~5 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для идентификации событий транслокаций было необходимо провести анализ результатов нанопорового молекулярного детектирования. С этой целью измеренные зависимости тока от времени были охарактеризованы в три этапа: построение и вычитание базовой линии, поиск событий транслокаций по пороговому значению тока, фильтра-

ция событий и последующий анализ достоверных данных.

Сначала, используя ПО OriginLab, задавалась базовая линия тока методом (фильтром) Савицкого – Голея [30], принцип действия которого заключается в проведении локальной полиномиальной регрессии вокруг каждой точки (значения тока) и создании нового сглаженного значения для этих точек. Метод Савицкого – Голея позволяет сохранить амплитуду и длительность коротких событий транслокации, при этом нивелировать влияние длительных изменений уровня тока, связанных с электрохимическими особенностями измерений ионного тока по двухэлектродной схеме. После сглаживания кривой значение базовой линии вычиталось из значения тока, формируя массив данных, удобный для автоматического поиска событий транслокаций.

На втором шаге, с помощью программы Clampfit (Molecular Devices) производился автоматический поиск событий транслокаций, удовлетворяющих заданным параметрам. Минимально необходимые параметры обнаружения событий включают в себя значения базовой линии и значение триггера (*trigger*). Поскольку мы исследуем сглаженные данные, значение базовой линии устанавливается, равное 0. *Триггер* — это пороговое значение тока, задаваемое как $I_t = SD \cdot x$, где SD — среднеквадратичное отклонение, x — произвольный коэффициент, значение которого влияет на эффективность детектирования событий транслокации. Слишком маленькое значение коэффициента приводит к детектированию паразитных сигналов, в то время как слишком большое приводит

к потере достоверных событий транслокаций. Исходя из этих соображений, нами было выбрано оптимальное значение $x = 4.5$.

Дополнительные параметры помогают точнее настроить поиск. Значение *Re-arm*, определяющее окончание события, устанавливалось равным 1 пА: данное значение наиболее близко к значению базовой линии, что необходимо для достоверного определения продолжительности событий. Значение *Rejection* (отклонение) используется для отсекаания событий большой амплитуды, связанных с внешними наводками и/или артефактами измерений. Дополнительно устанавливались значения пре-триггера (*pre-trigger*) и пост-триггера (*post-trigger*), помогающие добавить фиксированные участки до и после события для получения информации о форме обнаруженного сигнала. В нашем случае $T_{pre-trigger} = T_{post-trigger} = 2$ мс. В результате поиска транслокаций формировался массив данных, содержащий информацию о каждом обнаруженном событии.

Третий шаг обработки полученных данных представляет собой фильтрацию найденных событий. Для этого вручную удалялись кластеры шумовых событий, а также автоматически удалялись артефакты поиска и события, удовлетворяющие соотношению $I_{peak} > 2I_{antipeak}$. Такое соотношение необходимо для удаления симметричных событий, являющихся следствием электрических помех.

В ходе анализа событий транслокаций молекул ДНК 10 000 п.о. была построена зависимость амплитуды транслокаций от их продолжительности (рис. 3), демонстрирующая возможность одномолекулярного детектирования.

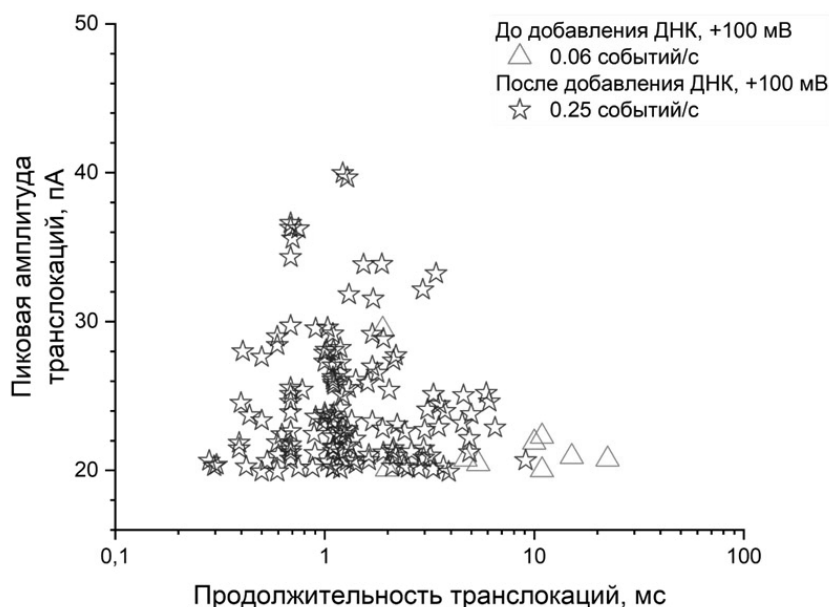


Рис. 3. Зависимость пиковой амплитуды транслокаций от продолжительности транслокаций для молекул ДНК 10 000 п.о. при $U = 0.1$ В

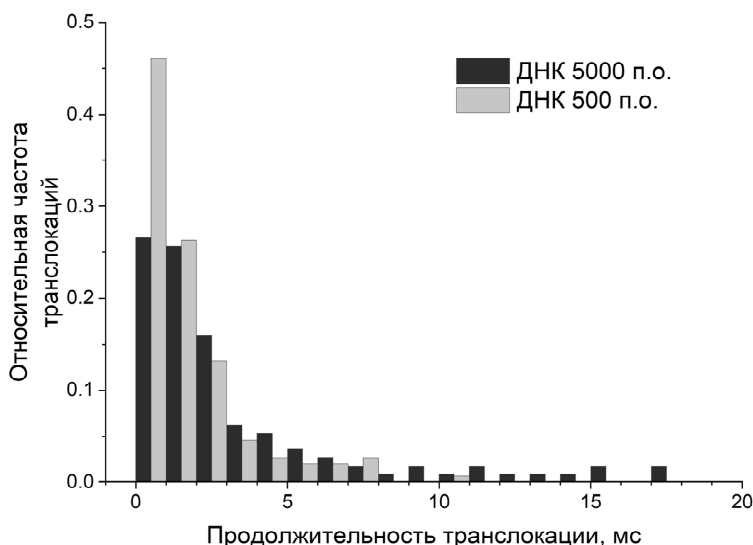


Рис. 4. Распределение событий транслокаций по продолжительности для молекул ДНК 5000 и 500 п.о.

Частота событий до/после добавления ДНК изменилась с 0.06 событие/с до 0.25 событие/с. Кроме того, события после добавления ДНК характеризуются более продолжительными транслокациями, что может указывать на прохождение через пору крупных молекулярных соединений. Значительный разброс амплитуды и длительности транслокаций для молекул одной длины может быть связан с различной конформацией (полностью распутанная и частично запутанная) молекул в момент прохождения через внутренний объем поры.

Анализ экспериментальных данных, полученных в ходе эксперимента с молекулами ДНК длинами 5000 и 500 п.о., показал нелинейную зависимость продолжительности транслокаций от длины молекул (рис. 4). Медианное значение времени транслокаций для 5000 и 500 п.о. составило 1.7 мс и 1.09 мс соответственно, что характеризует уменьшение времени транслокаций для более коротких молекул на 35%. Это может быть связано со сложным и не до конца изученным механизмом прохождения молекул ДНК через внутренний объем поры, в котором существенную роль играют процессы взаимодействия молекул со стенками поры. Можно предположить, что взаимодействие молекул ДНК со стенками нанопоры оказывает доминирующее влияние на длительность транслокаций по сравнению с длиной молекулы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была продемонстрирована возможность электрического детектирования одиночных

молекул ДНК в твердотельной нанопоре. С помощью разработанной измерительной ячейки были получены зависимости ионного тока от времени для буфера без/с добавлением ДНК. Для анализа событий транслокаций использован алгоритм, заключающийся в обнаружении событий по пороговому значению. С его помощью были проанализированы события транслокаций для ДНК 10000 п.о., построена зависимость амплитуды транслокаций от их длительности и оценена частота событий. Проведены эксперименты по детектированию молекул ДНК 5000 и 500 п.о., обнаружена нелинейная зависимость длительности событий транслокаций от длины молекулы. Продемонстрировано, что при уменьшении длины молекул в 10 раз продолжительность транслокаций снижается на 35%.

Благодарности

Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 20-74-10117, <https://rscf.ru/project/20-74-10117/>): формирование нанопор, измерение ионных токов, анализ данных. Н.В. Ваулин и И.С. Мухин благодарят за финансовую поддержку грант Министерства образования и науки (FSRM-2023-0007): синтез образцов с твердотельными SiN-мембранами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu H., Zhou Q., Wang W., Fang F., Zhang J. Solid-State Nanopore Array: Manufacturing and Applications // Small. 2023. Vol. 19, iss. 6. Id. 2205680. DOI: 10.1002/sml.202205680
2. Kan X., Wu C., Wen L., Jiang, L. Biomimetic nanochannels: From fabrication principles to theoretical insights //

- Small Methods. 2022. Vol. 6, no. 4. Id. 2101255. DOI: 10.1002/smt.202101255
3. Kang Q., Guo W. Biomimetic smart nanopores and nanochannels // *Chemically Modified Nanopores and Nanochannels*. 2017. P. 85–102. DOI: 10.1016/B978-0-323-40182-1.00004-X
 4. Ouyang W., Han J. Universal amplification-free molecular diagnostics by billion-fold hierarchical nanofluidic concentration // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. Vol. 116, no. 33. P. 16240–16249. DOI: 10.1073/pnas.1904513116
 5. Zhang X., Dou H., Chen X., Lin M., Dai Y., Xia F. Solid-state nanopore sensors with enhanced sensitivity through nucleic acid amplification // *Analytical Chemistry*. 2023. Vol. 95, no. 47. P. 17153–17161. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c03806
 6. Shi W., Friedman A.K., Baker L.A. Nanopore sensing // *Analytical chemistry*. 2017. Vol. 89, no. 1. P. 157–188. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04260
 7. Sen P., Gupta M. Single nucleotide detection using bilayer MoS₂ nanopores with high efficiency // *RSC advances*. 2021. Vol. 11, no. 11. P. 6114–6123. DOI: 10.1039/d0ra10222a
 8. Yang H., Li Z., Si W., Lin K., Ma J., Li K., Sun L., Sha J., Chen Y. Identification of single nucleotides by a tiny charged solid-state nanopore // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2018. Vol. 122, no. 32. P. 7929–7935. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b06056
 9. He Y., Tsutsui M., Zhou Y., Miao X.S. Solid-state nanopore systems: from materials to applications // *NPG Asia Materials*. 2021. Vol. 13, no. 1. Id. 48. DOI: 10.1038/s41427-021-00313-z
 10. Goto Y., Akahori R., Yanagi I., Takeda K.I. Solid-state nanopores towards single-molecule DNA sequencing // *J Hum Genet*. 2020. Vol. 65, no. 1. P. 69–77. DOI: 10.1038/s10038-019-0655-8
 11. Deamer D., Akeson M., Branton D. Three decades of nanopore sequencing // *Nature biotechnology*. 2016. Vol. 34, no. 5. P. 518–524. DOI: 10.1038/nbt.3423
 12. Lee K., Park K.B., Kim H.J., Yu J.S., Chae H., Kim H.M., Kim K.B. Recent progress in solid state nanopores // *Advanced materials*. 2018. Vol. 30, no. 42. Id. 1704680. DOI: 10.1002/adma.201704680
 13. Asandei A., Di Muccio G., Schiopu I., Mereuta L., Dragomir I.S., Chinappi M., Luchian T. Nanopore-Based Protein Sequencing Using Biopores: Current Achievements and Open Challenges // *Small Methods*. 2020. Vol. 4, iss. 11. Id. 1900595. DOI: 10.1002/smt.201900595
 14. Hu R., Tong X., Zhao Q. Four aspects about solid-state nanopores for protein sensing: fabrication, sensitivity, selectivity, and durability // *Advanced healthcare materials*. 2020. Vol. 9, no. 17. Id. 2000933. DOI: 10.1002/adhm.202000933
 15. Xue L., Yamazaki H., Ren R., Wanunu M., Ivanov A.P., Edel J.B. Solid-state nanopore sensors // *Nature Reviews Materials*. 2020. Vol. 5. P. 931–951. DOI: 10.1038/s41578-020-0229-6
 16. Lebedev D., Malyshev G., Ryzhkov I., Mozharov A., Shugurov K., Sharov V., Panov M., Tumkin I., Afonicheva P., Evstrapov A., Bukatin A., Mukhin, I. Focused ion beam milling based formation of nanochannels in silicon-glass microfluidic chips for the study of ion transport. // *Microfluidics and nanofluidics*. 2021. Vol. 25. Id. 51. DOI: 10.1007/s10404-021-02450-x
 17. Dekker C. Solid-state nanopores // *Nature nanotechnology*. 2007. Vol. 2, no. 4. P. 209–215. DOI: 10.1038/nnano.2007.27
 18. Fologea D., Uplinger J., Thomas B., McNabb D.S., Li J. Slowing DNA translocation in a solid-state nanopore // *Nano letters*. 2005. Vol. 5, no. 9. P. 1734–1737. DOI: 10.1021/nl051063o
 19. Plesa C., Kowalczyk S.W., Zinsmeister R., Grosberg A.Y., Rabin Y., Dekker C. Fast translocation of proteins through solid state nanopores // *Nano letters*. 2013. Vol. 13, no. 2. P. 658–663. DOI: 10.1021/nl3042678
 20. Kawaguchi T., Tsutsui M., Murayama S., Leong I.W., Yokota K., Komoto Y., Taniguchi M. Enhanced Nanoparticle Sensing in a Highly Viscous Nanopore // *Small Methods*. 2024. Vol. 8, iss. 8. Id. 2301523. DOI: 10.1002/smt.202301523
 21. Yuan Z., Liu Y., Dai M., Yi X., Wang, C. Controlling DNA translocation through solid-state nanopores // *Nanoscale research letters*. 2020. Vol. 15. Id. 80. DOI: 10.1186/s11671-020-03308-x
 22. Mini Analysis Program (RRID: SCR_002184). URL: https://scicrunch.org/resolver/SCR_002184 (дата обращения 28.07.2024).
 23. Easy Electrophysiology makes patch-clamp analysis simple. URL: <https://www.easyelectrophysiology.com/> (дата обращения 28.07.2024).
 24. Advancing scientific discovery. URL: <https://www.moleculardevices.com/> (дата обращения 28.07.2024).
 25. Raillon C., Granjon P., Graf M., Steinbock L.J., Radenovic A. Fast and automatic processing of multi-level events in nanopore translocation experiments // *Nanoscale*. 2012. Vol. 4, no. 16. P. 4916–4924. DOI: 10.1039/C2NR30951C
 26. Forstater J.H., Briggs K., Robertson J.W.F., Ettedgui J., Motta-Rose O., Vaz C., Kasianowicz J.J., Tabard-Cossa V., Balijepalli A. MOSAIC: A Modular Single Molecule Analysis Interface for Decoding Multi-state Nanopore Data // *Analytical chemistry*. 2016, Vol. 88, no. 23. P. 11900–11907. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03725
 27. Plesa C., Dekker C. Data analysis methods for solid-state nanopores // *Nanotechnology*. 2015. Vol. 26, no. 8. Id. 084003. DOI: 10.1088/0957-4484/26/8/084003
 28. Tu J., Meng H., Wu L., Xi G., Fu J., Lu Z. EasyNanopore: a ready-to-use pocessing software for translocation events in nanopore translocation experiments // *Langmuir*. 2021. Vol. 37, iss. 33. P. 10177–10182. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c01597
 29. Lebedev D.V., Vaulin N.V., Afonicheva P.K., Vorobyov A.A., Mozharov A.M., Sharov V.A., Mikhailovskii V.Yu., Kirilenko D.A., Permyakov D.V., Logunov L.S., Ivanov Yu.D., Ryzhkov I.I., Bukatin A.S., Evstrapov A.A., Makarov S.V., Mukhin I.S. Ultra-Low Intensity Light-Driven Ionic Conductivity through a Plasmonic Nanopore // *ACS Applied Nano Materials*. 2024. Vol. 7, no. 14. P. 16172–16181. DOI: 10.1021/acsanm.4c02108

30. Savitzky A., Golay M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures // Analytical chemistry. 1964. Vol. 36, no. 8. P. 1627–1639. DOI: 10.1021/ac60214a047

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия (Кириленко Д.А., Мухин И.С.)

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия (Аблеев А.Н., Иванов Ю.Д.)

Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

(Афоницева П.К., Лебедев Д.В., Букатин А.С., Евстапов А.А.)

Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алфёрова Российской академии наук, Россия

(Ваулин Н.В., Лебедев Д.В., Букатин А.С., Мухин И.С.)

Контакты: Афоницева Полина Константиновна,
polina.afonicheva@gmail.com

Материал поступил в редакцию 05.08.2024

ELECTROCHEMICAL DETECTION OF SINGLE DNA MOLECULES WITH A SOLID-STATE NANOPORE

P. K. Afonicheva¹, N. V. Vaulin², D. V. Lebedev^{1,2}, A. S. Bukatin^{1,2},
D. A. Kirilenko³, A. N. Ableev⁴, Yu. D. Ivanov⁴, I. S. Mukhin^{2,3}, A. A. Evstrapov¹

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia*

²*Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science*

St. Petersburg National Research Academic University of RAS, St. Petersburg, Russia

³*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Russia*

⁴*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*

We demonstrated the electrochemical detection of single DNA molecules using a thin SiN membrane with a nanopore. Experiments were aimed at a record of an ion current for a buffer solution without/with 10k, 5k, and 500 b.p. DNA molecules. Obtained data was analyzed by a developed algorithm for the detection of translocation events through the nanopore. This algorithm allows us to analyze the amplitude, duration, and frequency of detected events in order to analyze the properties of the detected molecules. In the case of 5k and 500 b.p. DNA, a nonlinear dependence of the translocation time on their length is observed. It is shown that a 10-fold decrease in the length of molecules leads to a 35% decrease in the translocation time. The translocation detection possibility sets the basis for the future development of a solid-state nanopore sensor.

Keywords: nanopore, solid-state nanopore, microfluidics, ion transport, SiN membranes, biosensors, DNA, DNA translocation

REFERENCES

1. Liu H., Zhou Q., Wang W., Fang F., Zhang J. Solid-State Nanopore Array: Manufacturing and Applications. *Small*, 2023, vol. 19, iss. 6, Id. 2205680. DOI: 10.1002/smll.202205680
2. Kan X., Wu C., Wen L., Jiang, L. Biomimetic nanochannels: From fabrication principles to theoretical insights. *Small Methods*, 2022, vol. 6, no. 4, Id. 2101255. DOI: 10.1002/smt.202101255
3. Kang Q., Guo W. Biomimetic smart nanopores and nanochannels. *Chemically Modified Nanopores and Nanochannels*, 2017, pp. 85–102. DOI: 10.1016/B978-0-323-40182-1.00004-X
4. Ouyang W., Han J. Universal amplification-free molecular diagnostics by billion-fold hierarchical nanofluidic concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, vol. 116, no. 33, pp. 16240–16249. DOI: 10.1073/pnas.1904513116
5. Zhang X., Dou H., Chen X., Lin M., Dai Y., Xia F. Solid-state nanopore sensors with enhanced sensitivity through nucleic acid amplification. *Analytical Chemistry*, 2023, vol. 95, no. 47, pp. 17153–17161. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c03806
6. Shi W., Friedman A.K., Baker L.A. Nanopore sensing. *Analytical chemistry*, 2017, vol. 89, no. 1, pp. 157–188. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04260
7. Sen P., Gupta M. Single nucleotide detection using bilayer MoS₂ nanopores with high efficiency. *RSC advances*, 2021, vol. 11, no. 11, pp. 6114–6123. DOI: 10.1039/d0ra10222a
8. Yang H., Li Z., Si W., Lin K., Ma J., Li K., Sun L., Sha J., Chen Y. Identification of single nucleotides by a tiny charged solid-state nanopore. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2018, vol. 122, no. 32, pp. 7929–7935. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b06056
9. He Y., Tsutsui M., Zhou Y., Miao X.-S. Solid-state nanopore systems: from materials to applications. *NPG Asia Materials*, 2021, vol. 13, no. 1, Id. 48. DOI: 10.1038/s41427-021-00313-z
10. Goto Y., Akahori R., Yanagi I., Takeda K.I. Solid-state nanopores towards single-molecule DNA sequencing. *J. Hum. Genet.*, 2020, vol. 65, no 1, pp. 69–77. DOI: 10.1038/s10038-019-0655-8
11. Deamer D., Akeson M., Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nature biotechnology*, 2016, vol. 34, no. 5, pp. 518–524. DOI: 10.1038/nbt.3423
12. Lee K., Park K.B., Kim H.J., Yu J.S., Chae H., Kim H.M., Kim K.B. Recent progress in solid state nanopores. *Advanced materials*, 2018, vol. 30, no. 42, Id. 1704680. DOI: 10.1002/adma.201704680
13. Asandei A., Di Muccio G., Schiopu I., Mereuta L., Dragomir I.S., Chinappi M., Luchian T. Nanopore-Based Protein Sequencing Using Biopores: Current Achievements and Open Challenges. *Small Methods*, 2020, vol. 4, iss. 11, Id. 1900595. DOI: 10.1002/smt.201900595
14. Hu R., Tong X., Zhao Q. Four aspects about solid-state nanopores for protein sensing: fabrication, sensitivity, selectivity, and durability. *Advanced healthcare materials*, 2020, vol. 9, no. 17, Id. 2000933. DOI: 10.1002/adhm.202000933
15. Xue L., Yamazaki H., Ren R., Wanunu M., Ivanov A.P., Edel J.B. Solid-state nanopore sensors. *Nature Reviews*

- Materials*, 2020, vol. 5, pp. 931–951. DOI: 10.1038/s41578-020-0229-6
16. Lebedev D., Malyshev G., Ryzhkov I., Mozharov A., Shugurov K., Sharov V., Panov M., Tumkin I., Afonicheva P., Evstrapov A., Bukatin A., Mukhin I. Focused ion beam milling based formation of nanochannels in silicon-glass microfluidic chips for the study of ion transport. *Microfluidics and nanofluidics*, 2021, vol. 25, Id. 51. DOI: 10.1007/s10404-021-02450-x
 17. Dekker C. Solid-state nanopores. *Nature nanotechnology*, 2007, vol. 2, no. 4, pp. 209–215. DOI: 10.1038/nnano.2007.27
 18. Fologea D., Uplinger J., Thomas B., McNabb D.S., Li J. Slowing DNA translocation in a solid-state nanopore. *Nano letters*, 2005, vol. 5, no. 9, pp. 1734–1737. DOI: 10.1021/nl051063o
 19. Plesa C., Kowalczyk S.W., Zinsmeister R., Grosberg A.Y., Rabin Y., Dekker C. Fast translocation of proteins through solid state nanopores. *Nano letters*, 2013, vol. 13, no. 2, pp. 658–663. DOI: 10.1021/nl3042678
 20. Kawaguchi T., Tsutsui M., Murayama S., Leong I.W., Yokota K., Komoto Y., Taniguchi M. Enhanced Nanoparticle Sensing in a Highly Viscous Nanopore. *Small Methods*, 2024, vol. 8, iss. 8, Id. 2301523. DOI: 10.1002/smt.202301523
 21. Yuan Z., Liu Y., Dai M., Yi X., Wang C. Controlling DNA translocation through solid-state nanopores. *Nanoscale research letters*, 2020, vol. 15, Id. 80. DOI: 10.1186/s11671-020-03308-x
 22. FDI Lab. SciCrunch Infrastructure. *Mini Analysis Program* (RRID: SCR_002184). URL: https://scicrunch.org/resolver/SCR_002184 (accessed 28.07.2024).
 23. *Easy Electrophysiology makes patch-clamp analysis simple*. URL: <https://www.easyelectrophysiology.com/> (accessed 28.07.2024).
 24. *Molecular Devices. Advancing scientific discovery*. URL: <https://www.moleculardevices.com/> (accessed 28.07.2024).
 25. Raillon C., Granjon P., Graf M., Steinbock L.J., Radenovic A. Fast and automatic processing of multi-level events in nanopore translocation experiments. *Nanoscale*, 2012, vol. 4, no. 16, pp. 4916–4924. DOI: 10.1039/C2NR30951C
 26. Forstater J.H., Briggs K., Robertson J.W.F., Ettegui J., Marie-Rose O., Vaz C., Kasianowicz J.J., Tabard-Cossa V., Balijepalli A. MOSAIC: A Modular Single Molecule Analysis Interface for Decoding Multi-state Nanopore Data. *Analytical chemistry*, 2016, vol. 88, no. 23, pp. 11900–11907. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03725
 27. Plesa C., Dekker C. Data analysis methods for solid-state nanopores. *Nanotechnology*, 2015, vol. 26, no. 8, Id. 084003. DOI: 10.1088/0957-4484/26/8/084003
 28. Tu J., Meng H., Wu L., Xi G., Fu J., Lu Z. EasyNanopore: a ready-to-use processing software for translocation events in nanopore translocation experiments. *Langmuir*, 2021, vol. 37, iss. 33, pp. 10177–10182. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c01597
 29. Lebedev D.V., Vaulin N.V., Afonicheva P.K., Vorobyov A.A., Mozharov A.M., Sharov V.A., Mikhailovskii V.Yu., Kirilenko D.A., Permyakov D.V., Logunov L.S., Ivanov Yu.D., Ryzhkov I.I., Bukatin A.S., Evstrapov A.A., Makarov S.V., Mukhin I.S. Ultra-Low Intensity Light-Driven Ionic Conductivity through a Plasmonic Nanopore. *ACS Applied Nano Materials*, 2024, vol. 7, no. 14, pp. 16172–16181. DOI: 10.1021/acsanm.4c02108
 30. Savitzky A., Golay M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry*, 1964, vol. 36, no. 8, pp. 1627–1639. DOI: 10.1021/ac60214a047

Contacts: Afonicheva Polina Konstantinovna,
polina.afonicheva@gmail.com

Article received by the editorial office on 05.08.2024

INTRODUCTION

Currently, there is increased interest in interdisciplinary research aimed at developing new devices with integrated micro- and nanostructures for biomedical applications [1]. To create such devices, a combination of micro- and nanofluidics methods with microelectronics technologies is used, which makes it possible to build highly selective sensors [2], the operating principle of which is based on the interaction of the studied object with solid-state nanoscale structures. One of the most promising areas for the development of this approach is the formation of nanosized holes (nanopores) in thin, impermeable membranes [3]. The production of nanopores with specified diameter/length values from 1 to 100 nm opens up a wide range of possibilities for their application in biomedicine: concentration and isolation of nucleic acids (NA) [4, 5], analysis and detection of single biomolecules [6], NA sequencing [7, 8].

The most common principle of nanopore detection is recording the ion current flowing through a nanopore under the influence of an external electric field [9]. Detection occurs in a measuring electrochemical cell, which is independent (cis and trans) volumes, between which a thin membrane with an integrated nanopore is fixed. The applied electric field forms a directed transport of the studied molecules from the cis volume to the trans volume through the internal volume of the nanopore. The process of moving molecules through the nanopore (translocation event) is accompanied by an abrupt change (modulation) in the level of the recorded ion current. The amplitude and shape of the translocation event depend on the shape and size of the detected molecule, as well as on its rigidity, charge, and conformational properties [10].

Direct competitors of solid-state nanopores in relation to sequencing are biological nanopores [11], which are artificially synthesized transport proteins (α -HL, AeL, ClyA) [12], integrated into lipid membranes. Despite the fact that biological pores are actively used for DNA sequencing [13] and studying the transmembrane transport of biological molecules, they have a number of significant disadvantages, such as a limited service life and strict requirements for conditions of operating, storage (temperature, electrolyte concentration, and pH) [9], which significantly narrows the possibilities of their application. In turn, solid-state nanopores and nanochannels are a promising analogue, since they have good mechanical, thermal and chemical stability [14, 15], wide possibilities for modifying their sensory and selective properties [16], as well as good technological potential for serial production.

Despite a number of advantages, solid-state nanopores have not yet demonstrated the sensing properties required for DNA sequencing. The main obstacles

to this are the high rate of translocation of molecules in combination with the complex mechanism of interaction between the DNA molecule (containing both hydrophobic bases and a hydrophilic backbone) and the pore surface. These effects lead to the record of short signals with a low signal-to-noise ratio, which does not allow for the effective identification of individual nucleotides in DNA. The development of solid-state nanopore sensors capable of fully characterizing the detected biomolecules is a complex task due to the high rate of electrophoretic translocation [17] caused by the strong localization of the electric field in the pore region. The strong fields are due to the nanoscale structure and are necessary to generate a current prevailing over thermal noise, while the barriers of conformational entropy, electrostatic repulsion, and electroosmotic flow require bias voltages of at least 20–60 mV [18].

Typical translocation rates of NAs through solid-state nanopores are 1 base per 10–1000 ns [19]. At such high rates, short nucleic acid fragments (< 100 b.p.) are often undetectable. Thus, for a signal record, a wide bandpass (> 1 MHz) is required; in turn, it increases the thermal noise level and complicates detection. Often, additional mechanisms are used to reduce the translocation rate, such as changing the viscosity of the electrolyte [20], using optical tweezers or plasmonic structures [21].

In addition to optimizing the experimental conditions and detection methods, the processing of the received signals and the determination of the translocation event are of crucial importance. Most existing event detection methods involve the identification of stepwise changes in the ion current level. Current changes are calculated/ranked and cut off when a certain threshold value is reached (trigger). Such event search methods can be divided into two categories: the classical approach of user-defined threshold value applying programs such as MiniAnalysis [22], Easy Electrophysiology [23] and Clampfit [24], and more advanced methods using adaptive or local thresholds based on the obtained data, assuming that the base current is stable over time, and implemented in the programs OpenNanopore [25], MOSAIC [26], Transalyzer [27], EasyNanopore [28].

This work is devoted to the study of the possibility of detecting single DNA molecules of different lengths using a nanosized SiN pore, as well as statistical analysis of translocation events in order to study the mechanisms of DNA molecule passage through the internal volume of the nanopore.

RESOURCES AND TECHNIQUES

The work's samples are 40 nm thick, freely suspended SiN membranes containing a single, roughly 5 nm-diameter nanopore. At the first stage of structure

synthesis, a 40 nm thick SiN layer was formed on an annealed Si substrate by low-pressure chemical vapor deposition (LP-CVD). The Si substrate was then removed by plasma-chemical and anisotropic etching techniques, resulting in a freely suspended SiN membrane with an area of $\sim 900 \mu\text{m}^2$. Nanopores were formed in the resulting membrane by focused electron beam etching using a transmission electron microscope (TEM). This method allows the formation of solid-state nanopores of the required sizes with good reproducibility (Fig. 1).

Fig. 1. TEM images of three SiN nanopores 40 nm long and ~ 5 nm in diameter and the distribution of the diameters of the formed nanopores by size

In the experiments on detecting DNA molecules, we used a measuring cell developed by us and presented two independent cis- and trans-volumes formed by photopolymer 3D printing. In the cell, Ag/AgCl electrodes were installed to perform measurements using a two-electrode scheme, as well as a capillary system for supplying/removing the electrolyte buffer solution. The membrane with an integrated nanopore was hermetically fixed in the cell using elastic gaskets and connected the cis- and trans-volumes. During filling with a buffer solution, the measuring cell underwent a degassing to prevent the formation of air microbubbles near the nanopore. The cell filling technique was developed and described in detail in previous works [29].

A solution of 0.1 M KCl and 1X PBS (1:1), pH = 7.4, was used as a buffer electrolyte. Ion current measurements were performed using a source measurement meter, allowing measurements at a frequency of 50 kHz. The studied molecules in the experiments were double-stranded DNA of different lengths: 10 000 b.p., 5000 b.p., and 500 b.p. (SINTOL JSC).

EXPERIMENTAL STUDIES

At the first stage, the possibility of nanopore detection of 10 000 b.p. DNA molecules was investigated. For this purpose, an experiment was conducted aimed at detecting translocations after adding DNA molecules to a pure buffer solution. First, the stability of the ion current in a pure buffer solution was analyzed before adding DNA. The current measurements were carried out in the potentiostatic mode (the applied potential difference was fixed in time). The obtained potentiostatic curve of current dependence on time showed a current level of 244.9 pA with a root-mean-square deviation (RMS) of 10.6 pA ($U = 0.1$ V), which indicates a high purity of the solution, ensuring

the absence of parasitic translocation events. Next, a buffer solution containing 10 000 b.p. DNA molecules at a concentration of ~ 0.1 ng/ μL was added to the cell volume, including the negatively charged electrode (cis-volume, see Fig. 2). Under the action of the applied electric field, the negatively charged DNA molecules moved through the nanopore from the cis- to the trans-volume (Fig. 2). The average ion current level was 218.3 pA, with a standard deviation of 7.5 pA. After that, short jump-like changes in the ion current level (translocation events) were recorded, indicating the occurrence of DNA molecule transport through the internal volume of the nanopore.

Fig. 2. Scheme of the experiment for detection of single DNA molecules

The second stage of the work was to study the dependence of the duration of translocation events on the length of DNA molecules. The experiment was carried out for DNA molecules of 5000 and 500 bp in concentrations of 1.25 ng/ μL and 3.3 ng/ μL , respectively, similarly to the first stage.

To increase the signal-to-noise ratio in this experiment, a voltage of 0.3 V was applied. To ensure the purity of the experiment, measurements were carried out on another SiN nanopore sample with a diameter of ~ 5 nm.

RESULTS

To identify translocation events, it was necessary to analyze the results of nanopore molecular detection. For this purpose, the measured current-time dependences were characterized in three steps: baseline construction and subtraction, search for translocation events by current threshold value, event filtering and subsequent analysis of reliable data.

First, using the OriginLab software, the current value baseline was set using the Savitsky – Golay method (filter) [30], the principle of which is to perform a local polynomial regression around each point (current value) and create a new smoothed value for these points. The Savitsky – Golay method allows one to preserve the amplitude and duration of short translocation events, while leveling out the influence of long-term current value changes associated with the electrochemical features of ion current measurements using a two-electrode scheme. The baseline value was deducted from the current value after the curve was smoothed, creating a data array that was useful for the automated search for translocation events.

In the second step, using the Clampfit software (Molecular Devices), an automatic search for translocation events satisfying the specified parameters was

performed. The minimum required event detection parameters include the baseline values and the *trigger* value. Since we are investigating smoothed data, the baseline value is set to 0. The *trigger* is a current threshold value defined as $I_t = SD \cdot x$, where SD is the standard deviation, x is an arbitrary coefficient which value affects the efficiency of translocation event detection. When the coefficient value is too little, parasitic signals are detected, and when it is too large, trustworthy translocation events are lost. Based on these considerations, we selected the optimal value $x = 4.5$.

Additional parameters help to fine-tune the search. The *Re-arm* value, which determines the end of the event, was set to 1 pA this value is closest to the baseline value, which is necessary for reliable determination of the event duration. The *Rejection* value is used to reject large-amplitude events associated with external interference and/or measurement artifacts. Additionally, the *pre-trigger* and *post-trigger* values were set to add fixed sections before and after the event to obtain information about the shape of the detected signal. In our case, $T_{pre-trigger} = T_{post-trigger} = 2$ ms. As a result of the translocation search, a data array was formed containing information about each detected event.

The third step in processing the obtained data is filtering the found events. For this purpose, clusters of noise events were manually removed, and search artifacts and events satisfying the ratio $I_{peak} > 2I_{antipeak}$ were automatically removed. This ratio is necessary to remove symmetrical events resulting from electrical interference.

During the analysis of translocation events of 10 000 b.p. DNA molecules, a dependence of the amplitude of translocations on their duration was constructed (Fig. 3), demonstrating the possibility of single-molecule detection.

Fig. 3. Dependence of the peak amplitude of translocations on the duration of translocations for DNA molecules of 10 000 b.p. at $U = 0.1$ V

The event frequency before/after DNA addition changed from 0.06 event/s to 0.25 event/s. In addition, events after DNA addition are characterized by longer translocations, which may indicate the passage of large molecular compounds through the pore. A significant spread in the amplitude and duration of translocations for molecules of the same length may be due

to different conformations (completely untangled and partially entangled) of molecules at the time of passage through the internal volume of the pore.

Analysis of the experimental data obtained during the experiment with DNA molecules of 5000 and 500 b.p. lengths showed a nonlinear dependence of the translocation duration on the length of the molecules (Fig. 4). The median value of the translocation time for 5000 and 500 b.p. was 1.7 ms and 1.09 ms, respectively, which characterizes a decrease in the translocation time for shorter molecules by 35%. This may be due to the complex and not fully understood mechanism of DNA molecule passage through the internal volume of the pore, in which the processes of interaction of molecules with the pore walls play a significant role. It can be assumed that the interaction of DNA molecules with the walls of the nanopore has a dominant effect on the duration of translocations compared to the length of the molecules.

Fig. 4. Distribution of translocation events by duration for 5000 and 500 b.p. DNA molecules.

CONCLUSION

The work demonstrated the possibility of electrical detection of single DNA molecules in a solid-state nanopore. Using the developed measuring cell, the dependences of the ion current on time for the buffer without/with the addition of DNA were obtained. To analyze translocation events, an algorithm was used that consists in detecting events by a threshold value. With its help, translocation events were analyzed for 10 000 b.p. DNA, the dependence of the amplitude of translocation on their duration was constructed, and the frequency of events was estimated. Experiments were conducted to detect DNA molecules of 5000 and 500 b.p., a nonlinear dependence of the duration of translocation events on the length of the molecule was discovered. It was demonstrated that with a 10-fold decrease in the length of the molecules, the duration of translocations decreases by 35%.