ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Ж.И. АЛФЕРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Ваулин Никита Васильевич

# ИССЛЕДОВАНИЕ ИОННОГО И МОЛЕКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В БИОСЕНСОРАХ НА ОСНОВЕ ТВЕРДОТЕЛЬНЫХ НАНОПОР ИЗ НИТРИДА КРЕМНИЯ

Специальность 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук,

Лебедев Денис Владимирович

Санкт-Петербург

2025

# СОДЕРЖАНИЕ

**ВВЕДЕНИЕ** ..... 4

1. **Литературный обзор** ..... 12

1.1 Этапы развития нанопорового детектирования ..... 12

1.2 Теоретические основы ионного и молекулярного транспорта в твердотельных нанопорах ..... 20

1.3 Принцип нанопорового детектирования и фиксации одиночных молекул ..... 30

1.4 Виды твердотельных мембран, методы синтеза и применения нанопор 46

2. **Описание экспериментальных установок и методов** ..... 51

2.1 Формирование одиночных $SiN_x$ нанопор ..... 51

2.2 Формирование Au плазмонной антенны-бабочки на поверхности $SiN_x$ мембраны ..... 55

2.3 Создание измерительных ячеек для электрохимических экспериментов ..... 57

2.4 Подготовка образцов и методика проведения электрохимических измерений ..... 63

3. **Исследование ионного и молекулярного транспорта в нанопорах** ..... 77

3.1. Исследование ионной проводимости одиночных $SiN_x$ нанопор при различных концентрациях электролита ..... 77

3.2 Управление ионной проводимостью одиночных $SiN_x$ нанопор с помощью лазерного оптического излучения ..... 83

3.3 Исследование свойств плазмонных Au антенн-бабочек ..... 87

3.4 Влияние лазерного излучения на ионную проводимость одиночной плазмонной нанопоры ..... 92

3.5 Управление ионной проводимостью одиночных нанопор с помощью широкополосного оптического излучения ..... 96

3.6 Управление ионной проводимостью одиночных плазмонных нанопор с помощью широкополосного оптического излучения ..... 102

3.7 Потенциостатические исследования ионной проводимости пористых $Al_2O_3$ и $C/Al_2O_3$ мембран ..... 105

3.8 Исследование методов детектирования и фиксации одиночных биологических молекул в твердотельных нанопорах ..... 109

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ** ..... 118

Благодарности..... 121
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ ..... 122
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... 123

# ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день, в мире существует потребность в развитии высокоточных методов исследования биологических молекул [1], разработке новых видов биологических сенсоров [2], а также совершенствовании инструментов генетического анализа [3]. Технологии point-of-care диагностики [4], методы АСМ и SERS, а также микроэлектродные тест системы [5,6] активно применяются для селективного детектирования и исследования малых концентраций биологических молекул. Однако, данные технологии и методы характеризуются недостатком чувствительности для реализации детектирования одиночных молекул, а также сложностью измерительной системы и высокой трудоемкостью проведения экспериментов. Биологические сенсоры на основе одиночных наноразмерных пор (нанопор), в тонких непроницаемых мембранах, являются перспективной платформой, объединяющей высокую чувствительность для реализации одномолекулярного детектирования, а также возможность проведения исследований широкого класса биологических соединений без их предварительной модификации.

Общий принцип детектирования в одиночных нанопорах заключается в транспорте через их внутренний объем молекул исследуемого вещества под действием внешних сил. При прохождении через нанопору, молекула модулирует нанопоровый ионный ток, вызывая изменения регистрируемого электрического сигнала (сигнала транслокации). Амплитуда и продолжительность сигнала транслокации определяются размерами и физико-химическими свойствами детектируемой молекулы, что позволяет не только обнаруживать, но и исследовать свойства проходящих через нанопору одиночных молекул.

Нанопоровые сенсоры можно разделить на биологические и твердотельные. Биологические поры представлены классом порообразующих белков, встраиваемых в липидные мембраны. Благодаря низкому уровню электрических шумов, малому диаметру канала поры и возможностью интеграции с моторными белками, биологические поры характеризуются высокими сенсорными свойствами и активно применяются для секвенирования ДНК. Тем не менее, биологические

поры обладают рядом недостатков, включая сложность модификации структуры поры, чувствительность к условиям эксперимента, короткий срок службы и низкую эффективность в приложениях исследования крупных биологических молекул.

Применение твердотельных нанопор, представляющих собой наноразмерные отверстия в тонких непроницаемых мембранах, является перспективным направлением развития нанопоровых сенсоров. Преимуществами твердотельных пор перед биологическими аналогами являются высокая стойкость к внешним воздействиям, широкие возможности формирования мембран и пор с заданными размерами и свойствами поверхности, а также возможность модификации пор различными наноразмерными объектами для улучшения их сенсорных характеристик. Наиболее распространенными материалами твердотельных мембран являются аморфные пленки $SiN_x$, использующиеся и в данной работе, кремниевые композитные мембраны ($Si/TiO_2$, $Si/HfO_2$), а также двумерные мембраны (графен, MoS2) и пористые мембраны ($Al_2O_3$). К недостаткам твердотельных пор относятся низкое по сравнению с биологическими аналогами пространственное разрешение детектирования, высокий уровень электрических шумов и высокая скорость транслокации молекул через внутренний объем поры.

Твердотельные нанопоры активно используются для безметочного детектирования одиночных объектов и молекул, а также для исследований динамики транслокаций крупных биологических соединений (белков). Активно развивающимися направлениями применения являются: изучение специфических механизмов связывания; моделирование трансмембранного транспорта; преобразование энергии; использование в качестве ионных диодов.

Существует несколько направлений работ по улучшению сенсорных свойств твердотельных нанопоровых сенсоров. В первую очередь это оптимизация толщины мембраны и диаметра поры для наилучшего соответствия целям применения. Кроме того, существует возможность реализации управляемого ионного и молекулярного транспорта в нанопорах с помощью внешних воздействий (например, оптического излучения) или функционализации поры поверхностно активными веществами. Улучшения сенсорных свойств можно

также добиться путем модификации области поры наноразмерными объектами (плазмонными антеннами), способными улучшать ее транспортные характеристики.

Исходя из этого, работы по реализации управляемого ионного транспорта в твердотельных порах, а также работы по интеграции нанопор с другими наноразмерными структурами крайне важны для повышения эффективности работы нанопоровых сенсоров. Поиск и развитие новых вариантов применения твердотельных нанопор также является перспективным направлением работ в области нанопоровых технологий. Относительная простота формирования твердотельных пор с требуемыми характеристиками открывает широкие перспективы в областях исследования свойств белковых соединений и их функциональной динамики, без необходимости предварительной модификации таких структур.

Таким образом, исследования методов управления ионным транспортом в одиночных плазмонных $SiN_x$ нанопорах, а также разработка методов фиксации белковых молекул в области нанопоры, являются **актуальными** направлениями научно-исследовательской деятельности.

**Цель работы:**

Целью диссертации является исследование методов оптического управления ионной проводимостью твердотельных нанопор при создании сенсора для регистрации одиночных молекул белков.

Для достижения данной цели в рамках диссертации были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Отработка методики изготовления тонких свободноподвешенных $SiN_x$ мембран, толщиной 25-200 нм, с интегрированными одиночными нанопорами и плазмонными оптическими Au антеннами-бабочками.

2. Исследование влияния лазерного излучения λ = 632 нм мощностью $P_{опт}$ = 10 КВт/см$^2$ на ионную проводимость одиночных $SiN_x$ нанопор и одиночных $SiN_x$ нанопор с плазмонными Au оптическими антеннами в водном растворе KCl.
3. Исследование метода управления ионной проводимостью одиночных $SiN_x$ нанопор с плазмонными Au оптическими антеннами при помощи широкополосного λ = 400-1000 нм излучения низкой интенсивности $P_{опт}$ = 35 мВт/см$^2$ в растворе KCl.
4. Определение диапазона применимости метода управления ионной проводимостью одиночных $SiN_x$ нанопор путем изучения влияния оптического излучения на KCl ионный транспорт, объемный нагрев электролита и локальный нагрев в области нанопоры.
5. Исследование способа фиксации одиночных молекул белков в области $SiN_x$ нанопоры для возможности дальнейшего изучения функциональной активности белков в реальном времени с помощью нанопорового биосенсора.
6. Апробация способа фиксации одиночных молекул белков 20S-протеасомы длиной 15 нм и диаметром 11,5 нм в одиночных $SiN_x$ нанопорах под действием приложенного электрического поля.

**Научная новизна**

1. Впервые разработан метод оптического управления ионной проводимостью одиночных $SiN_x$ нанопор и одиночных $SiN_x$ нанопор с плазмонными Au оптическими антеннами в растворе KCl при помощи широкополосного λ = 400 - 1000 нм излучения галогенной лампы $P_{опт}$ = 35 мВт/см$^2$. Метод впервые позволил снизить плотность мощности внешнего оптического излучения для управления ионным транспортом $SiN_x$ нанопор по сравнению с существующими методами воздействия сфокусированным лазерным излучением.
2. Впервые экспериментально продемонстрировано влияние спектрального состава оптического излучения (широкополосное и лазерное излучение) на ионную проводимость одиночных $SiN_x$ нанопор в растворе KCl. Эффект фотовозбуждения поверхностных состояний в аморфных $SiN_x$ мембранах толщиной 30-40 нм, излучением λ = 400 - 1000 нм, приводит к изменению величины поверхностного

заряда на стенках нанопоры и изменению концентрации ионов в её внутреннем объеме.

3. Разработан метод фиксации одиночных белковых молекул в области одиночной $SiN_x$ нанопоры под действием приложенного электрического поля. Впервые продемонстрирована возможность фиксации одиночных молекул 20S-протеасомы под действием приложенного электрического поля.

**Практическая значимость**

1. Апробирован метод формирования свободноподвешенных $SiN_x$ мембран толщиной 25-200 нм, метод формирования одиночных нанопор заданного диаметра в $SiN_x$ мембранах с помощью литографии сфокусированным электронным пучком, а также метод формирования Au плазмонных антенн-бабочек с размерами $\lesssim$ 600 нм на поверхности свободно подвешенных $SiN_x$ мембран. Комплекс апробированных методов позволяет формировать устойчивые к агрессивным средам и механическим воздействиям одиночные $SiN_x$ нанопоры и одиночные $SiN_x$ нанопоры с плазмонными Au оптическими антеннами для применения в нанопоровых сенсорах.
2. Разработаны и изготовлены измерительные электрохимические ячейки оригинальной конструкции, обеспечивающие возможность проведения экспериментов по оптическому управлению ионной проводимостью одиночных $SiN_x$ нанопор, а также фиксации одиночных молекул белков в области $SiN_x$ нанопор.
3. Разработан метод фиксации одиночных молекул белков, позволяющий регистрировать молекулу белка в области одиночной $SiN_x$ нанопоры под действием приложенного электрического поля для возможности исследования функциональной активности белковых соединений в реальном времени.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Методы оптической и электронной литографии в сочетании с методами жидкостного анизотропного и плазмохимического травления позволяют

формировать свободноподвешенные $SiN_x$ мембраны с заданной толщиной в диапазоне от 25 до 200 нм и плазмонные Au оптические антенны на их поверхности, методика травления материала под действием электронного луча просвечивающего электронного микроскопа позволяет интегрировать одиночные нанопоры диаметром 5-10 нм в сформированные мембраны. Численное моделирование полученных плазмонных антенн и экспериментальные исследования показывают наличие локализованных плазмонных мод на длинах волн $\lambda = 773$ и $\lambda = 657$ нм.

2. Сфокусированное лазерное излучение $\lambda = 632$ нм мощностью $P_{опт} = 10$ КВт/см$^2$ увеличивает ионную проводимость одиночных $SiN_x$ нанопор в растворе KCl на 6% и одиночных $SiN_x$ нанопор с плазмонной Au оптической антенной на 10%.
3. Воздействие широкополосным $\lambda = 400$ - 1000 нм излучением мощностью $P_{опт} = 35$ мВт/см$^2$ обеспечивает увеличение ионной проводимости одиночных $SiN_x$ нанопор с плазмонными Au оптическими антеннами в растворе KCl на 35%.
4. Метод электрохимического детектирования и фиксации биологических соединений позволяет регистрировать одиночные молекулы белков 20S-протеасомы длиной 15 нм и диаметром 11,5 нм в области $SiN_x$ нанопоры под действием приложенного электрического поля.

**Апробация работы**

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международная конференция "ФизикА.СПб" 17–21 окт. 2022 (СПб, Россия), I ежегодная всероссийская молодежная конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2022» (СПб, Россия), Всероссийская конференция по электрохимии с международным участием «ЭЛЕКТРОХИМИЯ-2023» 23-27 Октября 2023 (Москва, Россия), Международная конференция "ФизикА.СПб" 23–27 окт. 2023 (СПб, Россия), II ежегодная всероссийская молодежная конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2023» (СПб, Россия),

Международная конференция "ФизикА.СПб" 21–25 окт. 2024 (СПб, Россия), III ежегодная всероссийская молодежная конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2024» (СПб, Россия).

**Личный вклад автора**

Диссертация Ваулина Н.В. является самостоятельной и оригинальной научно-исследовательской работой, вклад автора диссертации в которую был определяющим. Личный вклад автора состоит в проведении исследований по характеризации и анализу свойств одиночных $SiN_x$ нанопор, одиночных $SiN_x$ нанопор с плазмонными Au антеннами-бабочками, а также пористых мембран, в том числе в проведении экспериментов по исследованию ионного транспорта в данных структурах при различных концентрациях электролита. Автором были разработаны и апробированы методы управления транспортными характеристиками одиночных нанопор с помощью сфокусированного лазерного и широкополосного излучения. Автором был разработан метод фиксации одиночных белковых молекул в области нанопоры и проведена его апробация на примере молекул 20S-частиц протеасомы. Автором был проведены работы по подготовке, сборке и проведению представленных в работе электрохимическим экспериментов, а также работы по обработке и анализу полученных данных. Автор также принимал участие в подготовке научных публикаций по результатам исследований и представлении результатов работы на международных и всероссийских конференциях.

**Публикации**

Основные научные результаты опубликованы в 11 печатных трудах, из которых 5 входят в перечень журналов ВАК, 6 публикаций — в международные реферативные базы данных.

**Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и списка литературы из 106 наименований. Текст диссертации изложен на 130 страницах, содержит 44 рисунка и 2 таблицы.

# 1. Литературный обзор

## 1.1 Этапы развития нанопорового детектирования

Технологии синтеза, методики исследования и различные возможности применения наноразмерных объектов приковывают внимание научного сообщества на протяжении последних нескольких десятилетий. Прогресс в микроэлектронике, фотонике и молекулярной биологии кардинально изменил повседневную жизнь, сделав доступными методы генетического анализа [7], биологические сенсоры [8], адресную доставку лекарственных средств [9], а также тестирование в месте оказание помощи (point-of-care) [10]. Тем не менее существуют недостаточно изученные области науки, связанные со свойствами наноструктур и взаимодействием частиц (как биологических, так и небиологических) на молекулярном уровне. Сенсоры на основе тонких мембран с интегрированными наноразмерными отверстиями (нанопорами) являются перспективной платформой для исследования данных областей. Сенсоры на основе нанопор принято называть нанопоровыми, а методику обнаружения и анализа молекулярных соединений - нанопоровым детектированием. Общая совокупность нанопоровых сенсоров, методов измерений и направлений применения называется нанопоровыми технологиями.

Предпосылкой появления нанопоровых технологий является создание первого транзистора [11] и последовавшее за этим зарождение современной микроэлектроники. Развитие методов фотолитографии, технологий синтеза твердотельных структур и электронных измерительных приборов дало возможность работать с объектами микро- и нанометрового масштаба. Основой для развития нанопоровых технологий стал принцип Коултера (счетчик Коултера) [12], позволяющий детектировать частицы дисперсной среды по изменениям электрического поля, возникающим при прохождении частиц через микроотверстие в стенке ампулы, а также технологии микрофлюидики, позволяющие работать с объемами жидкостей в диапазоне $10^{-9}$ - $10^{-18}$ литров и манипулировать молекулами, растворенными в этих жидкостях [13]. Первыми практическими применениями микрофлюидных систем стали жидкостные

хроматографы, системы капиллярного электрофореза и технологии струйных принтеров [14]. Одновременно с этим активно исследовались малоизученные вопросы взаимодействия жидкостей с гидрофобными и гидрофильными поверхностями, процессы нуклеации газовых пузырей на границе раздела жидкости и стенок микроканалалов, а также методы очистки и пробоподготовки используемых в экспериментах реагентов. Немаловажной работой являлась отработка методов управления потоками жидкости в микроканалах с помощью электрических полей, давления, градиентов концентрации, температуры и т.д.

Концепция нанопорового детектирования появилась в 1980-х годах с развитием измерительных методов, позволяющих различать наноразмерные структуры как твердотельной (атомы кристаллической решетки) так и биологической (белковые молекулы) природы (см. рисунок 1 – а,б.) [15,16]. Однако, такие методы все еще не позволяли анализировать молекулы сложной структуры. Молекулярная биология и методы молекулярной динамики (МД) позволили получить информацию о структурных и конформационных свойствах большого числа биологических соединений (в первую очередь белков), межмолекулярных взаимодействиях, динамике процессов селективного синтеза и расщепления белковых соединений в клетках. Особый интерес представляло бурно развивающееся направление расшифровки последовательности нуклеотидов в цепочке ДНК (секвенирование). Прогресс в перечисленных областях науки сформировал запрос на появление высокоэффективного инструмента для детектирования и анализа наноразмерных объектов. В 1989 году Дэвид Димер сделал набросок молекулярного сенсора [17], основанного на непроницаемой мембране с интегрированной одиночной наноразмерной порой, способного детектировать одиночные молекулы и идентифицировать последовательность нуклеотидов ДНК (рисунок 1 – в.). Предложенная схема по сути являлась реализацией метода Коултера в наноразмерном масштабе. Принцип предложенного нанопорового детектирования заключался в регистрации изменений ионного транспорта поры, возникающих в момент прохождения через нее детектируемых молекул. Реализация возможности анализа свойств

наноразмерных объектов требует, чтобы размеры поры (диаметр и длина) были сопоставимы с размерами детектируемых объектов. Кроме того, материалы мембраны и поры должны обладать гидрофильными свойствами для эффективного заполнения внутреннего объема поры, а также быть совместимыми как с водными растворами электролитов, так и с биологическими соединениями. Полупроводниковые технологии конца прошлого века не позволили реализовать нанопоровый сенсор на основе одиночных пор в твердотельных мембранах. Уже существовавшие пористые твердотельные мембраны с плотно упакованными массивами микро- и нанопор (каналов) активно применялись в областях нано- и микрофильтрации жидкостей, опреснения воды, хранения энергии и разделение веществ [18]. Однако, такие структуры не подходят для приложений одномолекулярного детектирования благодаря ряду критических недостатков. Во-первых, длина пор в пористых мембранах во много раз (иногда даже на порядки) больше размеров исследуемых объектов (молекул, ионов и т.д.), что существенно снижает их сенсорные характеристики (рисунок 1 – б.). Во вторых, в пористых мембранах процесс детектирования и анализа происходит в массиве пор, взаимодействующих с большим количеством анализируемых частиц, исключая возможности детектирования и исследования структуры одиночных молекул. Исходя из этого, предложенный Димером концепт подразумевал использование в качестве мембраны липидный слой, а в качестве нанопоры – существующие в природе порообразующие белки, встраиваемые в липидную мембрану.

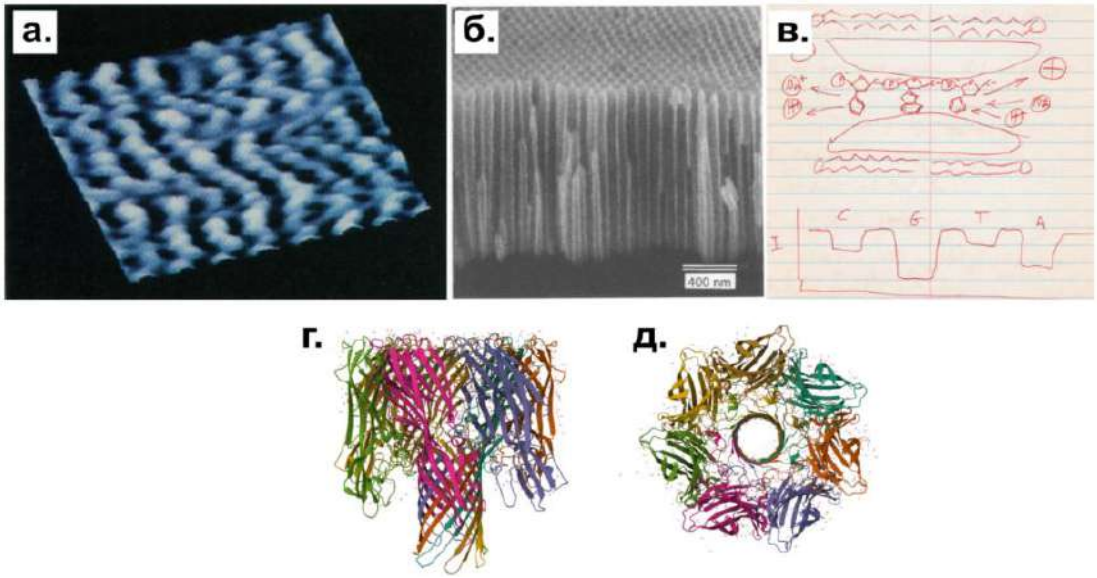


Рисунок 1 — а. АСМ-изображение молекул (цепочек) полиаланина адсорбированных на стекле (площадь изображения 34*34 Å) [16]. б. СЭМ-изображение поперечного сечения пористой мембраны с массивом Pt нанопор [105]. в. Скетч Д. Димера посвященный принципу детектирования отдельных нуклеотидов ДНК в нанопоровом сенсоре [17]. г,д. Структура молекулы альфа-гемолизина, используемой в качестве биологической нанопоры с внутренним диаметром 2.6 нм [20].

Использование порообразующих белков обусловлено их геометрическим строением, способностью к встраиванию в клеточные липидные мембраны, а также возможностью реализации ионного и молекулярного транспорта через внутренний канал (нанопору). Нанопоры в полупроницаемых мембранах и структурах биомолекул (обычно белков) отвечают множеству важнейших функций живых организмов, включая селективный транспорт, синтез, и расщепление отдельных молекул. Механизм калий-натриевого насоса [19], отвечающий за поддержание потенциала покоя и регулирование клеточного объема, заключается в селективном транспорте ионов калия и натрия через клеточную мембрану с помощью фермента аденозинтрифосфатазы, через наноразмерную полость которого реализуется транспорт ионов. Примерами синтеза и расщепления биологических соединений могут служить молекулы РНК-полимеразы и молекулы протеасомы, реализующие

синтез молекул РНК и протеолиз малых белков соответственно. В обоих случаях процессы синтеза и расщепления происходят во внутренних каналах (порах) молекул.

Относительная простота формирования тонкой липидной мембраны и интеграции в нее биологической поры позволили уже в 1996 году создать нанопоровый сенсор для детектирования объектов нанометрового размера [20]. Сенсор на основе порообразующего белка альфа-гемолизина (a-hemolysin), с диаметром поры 2.6 нм, продемонстрировал возможность детектирования одиночных молекул (цепей) ДНК и РНК длиной ~51 нм и ~71.4 нм, соответственно. Тем не менее, малая продолжительность нахождения молекул во внутреннем объеме поры (~100-200 мкс) ограничивала пространственное разрешение сенсора. Решением этой проблемы стало формирование комплексной структуры нанопоры с моторным белком, позволяющей управлять скоростью прохождения детектируемых молекул через внутренний объем нанопоры. Принцип действия такого комплекса представлен на рисунке 2 – а. В 2012 году с помощью биологического нанопорового сенсора было реализовано секвенирование ДНК [21]. В настоящее время на рынке коммерческих устройств генетического анализа присутствует высокопроизводительные секвенаторы ДНК с массивом биологических нанопор от компании Oxford nanopores.

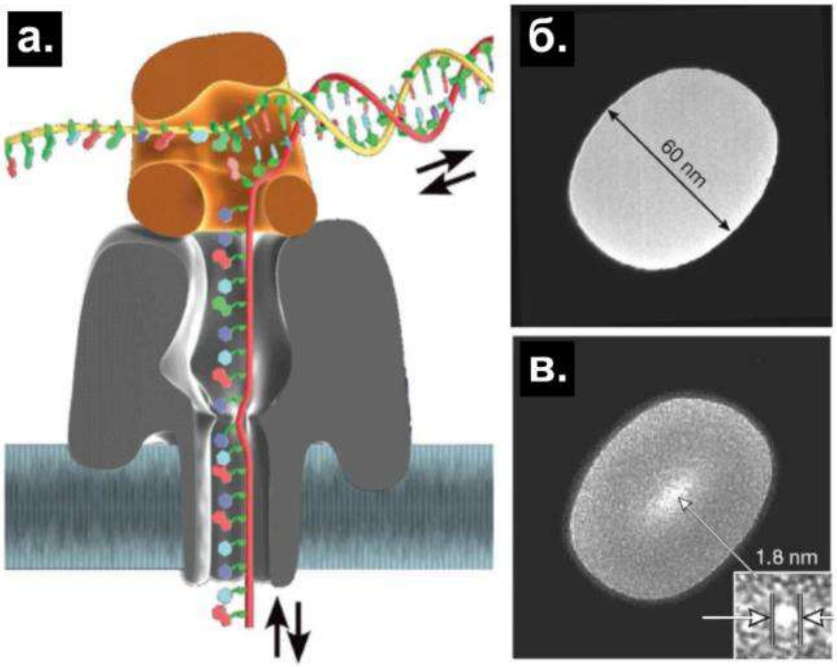


Рисунок 2 – а. Интеграция моторного белка ДНК полимеразы в нанопоровую структуру. Активность молекулы полимеразы регулирует скорость прохождения через пору одноцепочечной молекулы ДНК [21]. б. ПЭМ изображение сформированной сфокусированным ионным пучком ($Ar^+$) нанопоры диаметром 61 нм в $SiN_x$ мембране переменной толщины. в. Эта же пора диаметром 1.8 нм после переосаждения материала мембраны вследствие подбора интенсивности ионного пучка [22].

Использование уже готовых биологических решений позволило в короткий срок реализовать сложнейший нанопоровый сенсор биологических объектов, который в некоторых приложениях (например, секвенирование ДНК) может демонстрировать субнанометровое пространственное разрешение и чувствительность, позволяющую различать даже небольшие особенности в структурных и поверхностных свойствах детектируемых объектов. Однако, для многих сенсорных приложений применение биологических пор оказалось затруднено. Большинство биологических пор обладают диаметром в пределах 0.7-5.5 нм [23] что сужает возможность работы с молекулами больших размеров. В то же время, модификация структуры порообразующих белков является сложным процессом, а их функционализация полимерными составами невозможна ввиду

слабой совместимости белков с химическими составами. Моторные белки, позволяющие регулировать скорость прохождения через пору цепочек нуклеиновых кислот (НК), неприменимы для работы с белковыми или небиологическими молекулами, что негативно сказывается на пространственном разрешении детектирования. Существенными недостатками биологических нанопор являются: высокая чувствительность к внешним воздействиям, используемым растворам электролита, температуре, pH, а также сложности с модификацией пор твердотельными нанообъектами.

Многие недостатки биологических пор могут быть устранены путем перехода к твердотельным материалам. Формирование одиночной наноразмерной поры в непроницаемой твердотельной мембране открывает широкие возможности по химической функционализации и модификации твердотельных пор наноразмерными структурами. Более того, твердотельные нанопоровые сенсоры позволяют реализовывать различные стратегии детектирования, включая измерение туннельного тока, электрической емкости, оптических сигналов от одиночных молекул [24]. Возможность формирования одиночных твердотельных нанопор в тонких мембранах была впервые продемонстрирована в 2001 году [22]. Твердотельный нанопоровый сенсор представлял собой непроницаемую $SiN_x$ мембрану толщиной 500 нм в которой методом ионного травления (reactive ion etching) формировалась полость (углубление), в результате чего толщина мембраны локально уменьшалась до ~10 нм. Далее в тонкой области мембраны сфокусированным ионным пучком формировалась одиночная пора диаметром до 1.8 нм (см. рисунок 2– б,в.). Подбором режима ионного пучка (величины тока и времени экспозиции), удавалось изменять размеры поры как в меньшую, так и большую стороны. Активное развитие технологий твердотельных нанопор привело к бурному росту количества материалов, методов изготовления и модификации, а также направлений применения. Например, нанопоры, сформированные в квази 2D мембранах из графена длиной 1-5 нм, были продемонстрированы в 2010 году [25]. Обладая характерной толщиной в один или несколько монослоев, графеновые мембраны (как и другие 2D структуры) потенциально обладают наилучшим

пространственным разрешением среди всех видов материалов, применяемых для синтеза нанопор.

В последние годы нанопоровые технологии привлекают все большее количество научных коллективов, что видно из рисунка 3. Адаптация множества систем материалов для использования в качестве мембран и развитие технологий формирования пор обеспечивает возможность создания нанопоровых сенсоров с заданными сенсорными характеристиками, в том числе пригодных для решения узкоспециализированных задач. Несмотря на разнообразие, в подавляющем большинстве случаев принцип действия нанопоровых систем остается неизменным — детектирование и анализ молекулярных соединений производится в одиночной наноразмерной поре посредством измерения величины ионного тока, протекающего через пору.

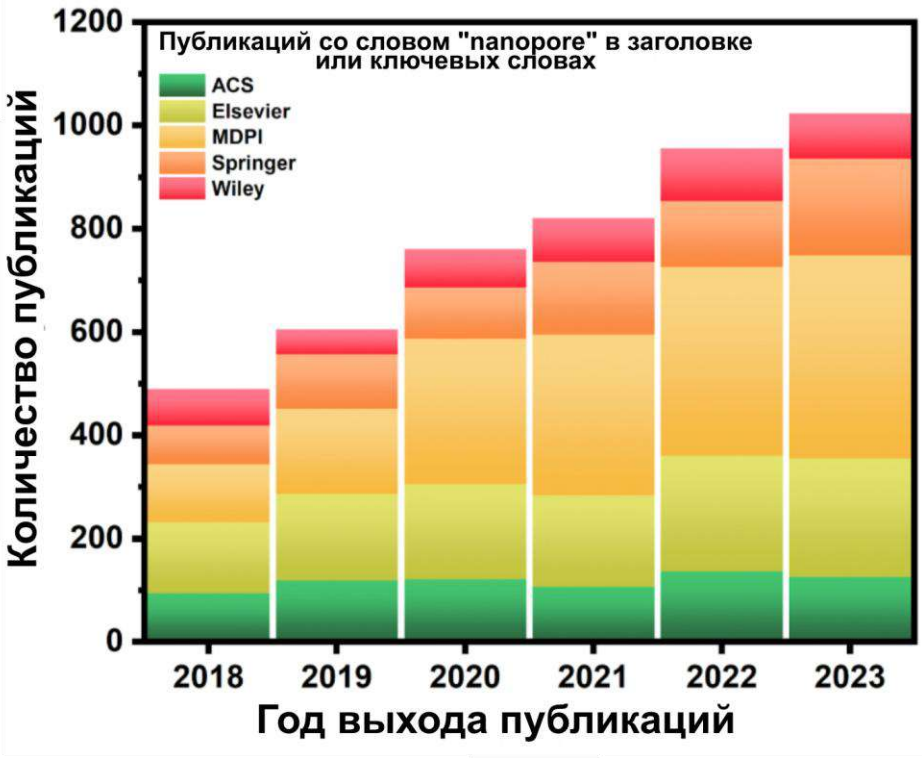


Рисунок 3 — Количество научных публикаций в журналах ведущих издательских домов в категории «Нанопоры» с 2018 года

## 1.2 Теоретические основы ионного и молекулярного транспорта в твердотельных нанопорах

Как уже говорилось ранее, нанопоровая система представляет собой тонкую мембрану с интегрированным одиночным отверстием — порой. Внутренний объем поры соединяет собой cis- и trans- объемы жидкости, находящихся по обе стороны от мембраны. Прикладывая к объемам внешние силы для генерации направленных потоков жидкости, становится возможным детектирование молекулярных соединений посредством регистрации изменений транспортных характеристик поры в момент прохождения через нее исследуемых молекул. Поскольку характерные диаметр и длина применяемых пор находятся в диапазоне 1-100 нм, нанопоровые сенсоры демонстрируют высокую чувствительность при детектировании и анализе одиночных молекул. Однако, малые размеры также накладывают строгие требования к технологиям синтеза и чистоте проведения экспериментов вследствие сильного влияния загрязнений и дефектов на характеристики сенсора. Для правильной интерпретации данных, получаемых в ходе нанопоровых измерений, необходимо понимание процессов ионного и молекулярного транспорта, а также представление о способах управления характеристиками пор в процессе эксперимента. В данной работе, теоретические основы ионного и молекулярного транспорта будут рассматриваться на примере твердотельных нанопор, поскольку они могут быть представлены в качестве модельных объектов за счет своей симметричной структуры и хорошо изученных физико-химических характеристик поверхности.

В общем случае, работы с нанопоровыми сенсорами (применение нанопор в качестве газовых анализаторов не рассматривается в данной работе) проходят с использованием буферных растворов электролитов и заключаются в проведении электрохимических измерений ионного тока, протекающего через нанопору. В таком случае, мембрану можно считать селективно проницаемым барьером, разделяющим две гомогенные фазы. Для преодоления этого барьера, молекулам или частицам необходимо сообщить силу, степень действия которой будет

приближенно определяться разностью потенциалов (градиентом потенциала) до и после мембраны, тогда:

$$F_{\text{д.с.}} = \frac{\Delta X}{l} \quad (1)$$

где $F_{\text{д.с.}}$ – движущая сила, $\Delta X$ – разность потенциалов, l – толщина мембраны. Зачастую в мембранных процессах основную роль играют химический ($\Delta\mu$) и электрический потенциалы ($\Delta F_{\text{э.п.}}$), сумма которых будет являться электрохимическим потенциалом. При переносе частиц или молекул от высокого к низкому потенциалу, среднюю движущую силу можно записать как:

$$F_{\text{д.с.средн}} = -\frac{\Delta X}{l} \quad (2)$$

В стационарном состоянии, когда движущая сила постоянна, через мембрану возникает поток J:

$$J = A * F_{\text{д.с.}} \quad (3)$$

где A – коэффициент пропорциональности. Если предположить идеальные условия системы:

$$a_i = x_i;\ \Delta \ln x_i \approx \left(\frac{1}{x_i}\right)\Delta x_i \quad (4)$$

где $a_i$ – активность компонентов раствора, $x_i$ – мольная доля, то движущую силу можно представить как безразмерную величину $F_{\text{б.р.}}$, включающую в себя вклады давления, электрического потенциала и концентрации:

$$F_{\text{б.р.}} = \frac{\Delta x_i}{x_i} + \frac{z_i F}{RT}\Delta E + \frac{V_i}{RT}\Delta P \quad (5)$$

где $z_i$ – валентность раствора, F – постоянная Фарадея, R – газовая постоянная, T – температура, $V_i$ – молярный объем, E – электрический потенциал, P – давление.

Методика измерения ионного тока заключается в прикладывании к cis- и trans- объемам системы (измерительной ячейки) разности потенциалов, после чего становится возможным измерение протекающего через пору ионного тока. Измерение ионного тока (проводимости поры) при фиксированной разности потенциалов, т.е. в потенциостатическом режиме, позволяет делать выводы о физико-химических и структурных свойствах используемой нанопоры.

Основными факторами, определяющими проводимость поры, являются ее размеры (диаметр, длина), геометрия канала, величина поверхностного заряда и концентрация используемого электролита. Большой диаметр поры обеспечивает большее значение измеряемого ионного тока, увеличивая соотношение сигнал/шум, однако снижает сенсорные свойства структуры по отношению к молекулам малого размера. В то же время большая длина нанопоры негативно сказывается как на проводимости структуры, так и на ее сенсорных свойства. Таким образом, наилучшими свойствами обладают поры с диаметром сравнимым с диаметром детектируемых молекул и как можно меньшей длиной. Проводимость нанопоры цилиндрической формы может быть теоретически рассчитана [26] при помощи формулы:

$$\mathrm{G} = \sigma \left( \frac{4l}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right)^{-1} \quad (6)$$

где σ – электропроводность раствора электролита, d – диаметр нанопоры, l – длина нанопоры (толщина мембраны). Первое слагаемое данной формулы можно представить как сопротивление канала поры $R_{channel}$. Наличие второго слагаемого следует из представления [27] общего сопротивления нанопоры как суммы сопротивления ее внутреннего канала ($R_{channel}$) и сопротивлений областей на входе и выходе ($R_{access}$):

$$R = R_{channel} + R_{access} \quad (7)$$

где $R_{access}$ рассматривается как плоский дисковый электрод с диаметром равным диаметру поры:

$$\mathrm{R_{access}} = \frac{\rho}{2d} \quad (8)$$

где $\rho$ - удельное сопротивление раствора электролита.

Формула (6) справедлива только для высоких концентраций буферного раствора электролита, при котором влиянием заряда поверхности мембраны (стенок поры) можно пренебречь.

Стенки нанопоры, после ее формирования в твердотельной мембране, зачастую характеризуются большим количеством дефектов и оборванных химических связей, возникающих в месте обрыва кристаллической решетки.

Следствием этого может являться наличие поверхностного электрического заряда на стенках нанопоры и поверхности мембраны. Знак и величина поверхностного заряда на границе контакта твердого тела с раствором электролита определяется изоэлектрической точкой данного материала, и может регулироваться подбором уровня pH раствора. Наиболее распространенными в нанопоровых исследованиях являются водные растворы электролитов KCl, NaCl, LiCl с близким к физиологическому значению pH (6-8). В таких условиях, основные системы нанопоровых материалов обладают ненулевой величиной поверхностного заряда. Ионы электролита стремятся экранировать поверхностный заряд твердого тела для возвращения системы в электронейтральное состояние. На границе раздела фаз поверхность\раствор происходит формирование двойного электрического слоя (ДЭС) ионов, заряженных противоположно относительно заряда поверхности твердого тела (противоионов). Структура ДЭС, представленная на рисунке 4 – а. [28]. В простейшем случае ДЭС можно разделить на две части - адсорбционный слой (называемой плотной частью ДЭС, слоем Гельмгольца или слоем Стерна) и диффузный слой. Адсорбционный слой представляет собой область плотно упакованных, адсорбированных на поверхности твердого тела противоинов. Толщина (размер) адсорбционного слоя $\delta_s$ равен размеру сольватированного противоиона. Диффузный слой представляет собой область повышенной концентрации сольватированных противоионов (а также небольшого количества коионов), размер которой определяется длиной Дебая:

$$\lambda = \sqrt{\frac{\varepsilon\varepsilon_0 R_g T}{2F^2 I_c}} = \frac{1}{\chi} \tag{9}$$

где $\varepsilon$ - диэлектрическая проницаемость, $\varepsilon_0$ - диэлектрическая постоянная вакуума, $R_g$ - универсальная газовая постоянная, T - температура, F - постоянная Фарадея, $I_c$ - ионная сила раствора (моль/м$^3$) электролита, определяемая как:

$$I_c = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n} c_i z_i^2 \tag{10}$$

где $c_i$ и $z_i$ - молярные концентрации и заряды ионов раствора соответственно. Для водного раствора KCl: $I_c = C_0$, где $C_0$ – концентрация электролита. Таким образом, присутствие концентрации электролита $c_i$ в знаменателе формулы (9) означает увеличение размера ДЭС при снижении концентрации электролита (см. рисунок 4 – б.).

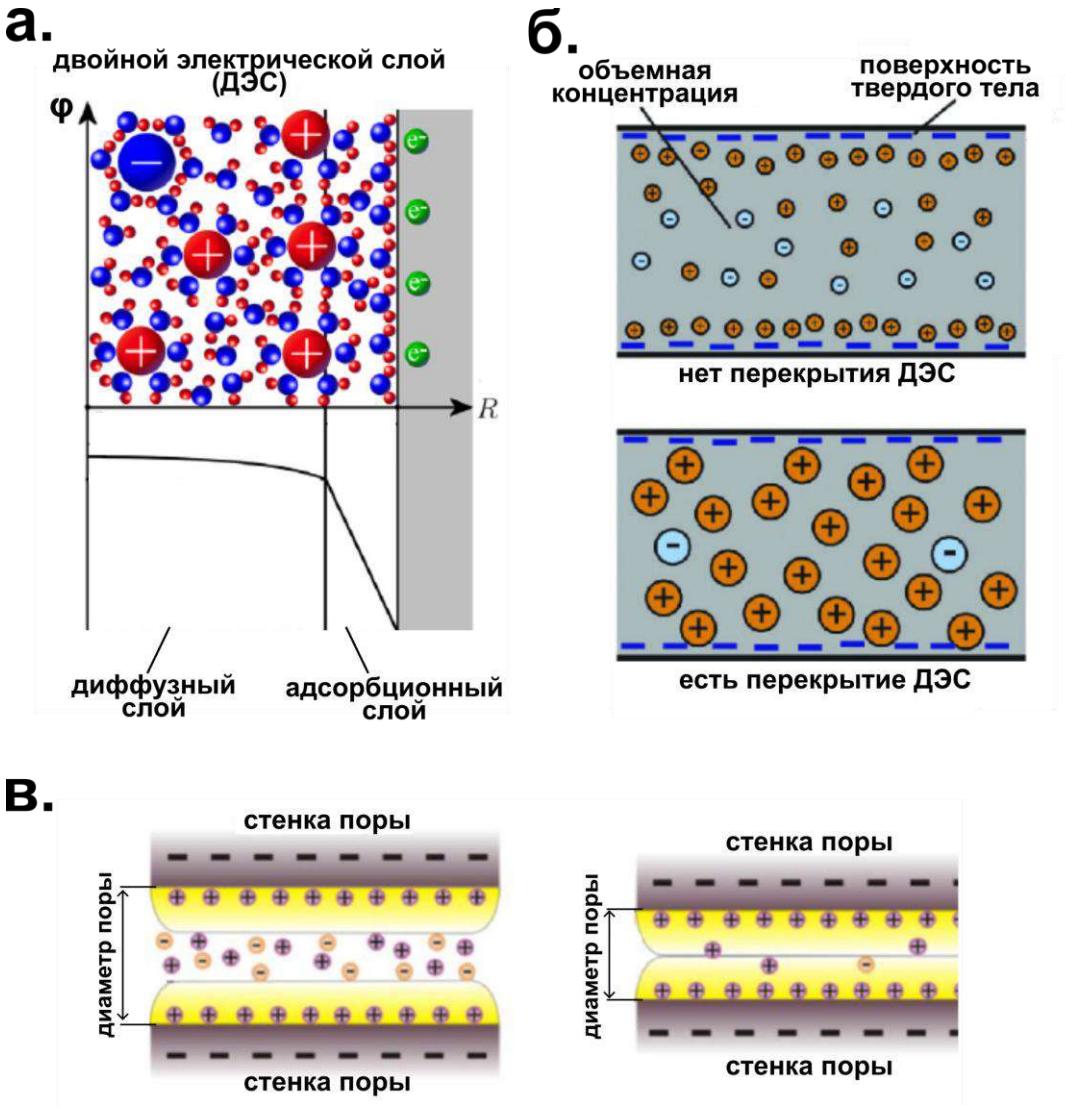


Рисунок 4 – а. Строение ДЭС у отрицательно заряженной поверхности твердого тела. б. Зависимость зарядовой селективности нанопор от концентрации электролита, верхний рисунок соответствует случаю высокой концентрации электролита и малым размерам ДЭС, нижний рисунок соответствует случаю низкой концентрации электролита и возникновению перекрытия ДЭС во внутреннем объеме поры. в. Зависимость зарядовой (а также стерической) селективности нанопор от диаметра канала, левый рисунок соответствует нанопоре большого диаметра без перекрытия ДЭС, правый рисунок соответствует

случаю поры малого диаметра и соприкосновению ДЭС от противоположных стенок внутри канала.

Размеры ДЭС для водного раствора KCl могут варьироваться от долей нанометра до десятков нанометров в зависимости от концентрации электролита (см. рисунок 5). Малый диаметр поры и низкая концентрация электролита могут приводить к ситуации, когда величина ДЭС будет превышать радиус поры $\lambda \gtrsim d$, как показано на рисунке 4 – б, в. Таким образом, ДЭС будут полностью занимать внутренний объем поры, реализуя условие перекрытия ДЭС, приводящее к возникновению сплошной области повышенной концентрации противоионов. Принято считать, что в случае перекрытия ДЭС, нанопора становится селективной по отношению к заряду движущихся через нее ионов и крупных молекулярных соединений. Таким образом, малый диаметр поры, большая величина поверхностного заряда и низкая концентрация электролита являются факторами формирования в нанопорах селективного транспорта.

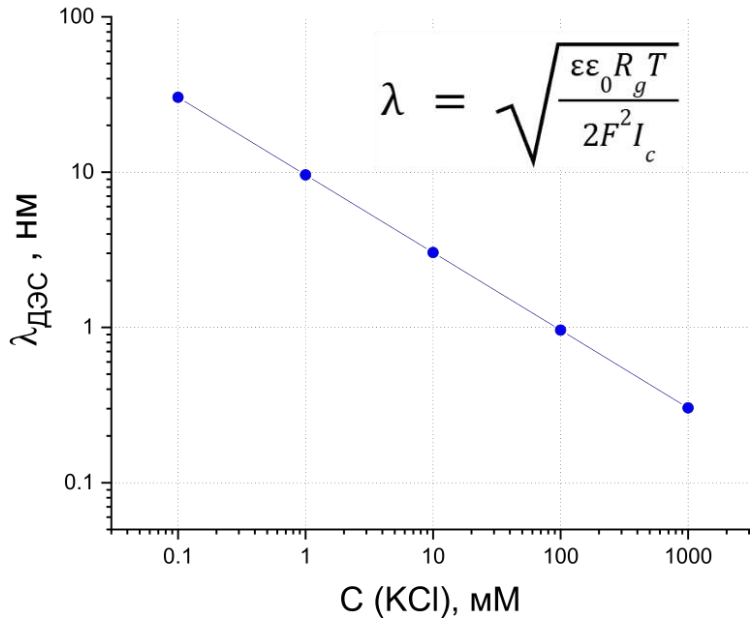


Рисунок 5 – Зависимость длины Дебая от концентрации водного раствора электролита KCl.

Кроме селективных свойств, повышенная концентрация ионов в ДЭС оказывает влияние и на проводимость поры. При низких концентрациях электролита, реальная проводимость структуры может быть выше расчетного значения, определяемого по формуле (6), поскольку в ней не учитывается поверхностный заряд стенок поры. Данный эффект был экспериментально проверен в ходе работ по исследованию ионного транспорта в одиночных нанопорах. Несоответствие экспериментальных и теоретических данных при низких концентрациях электролита, приводит к необходимости использования более сложных моделей, учитывающих поверхностный заряд твердого тела и конфигурацию ДЭС во внутреннем объеме нанопоры. Кроме того, определенные конфигурации ДЭС могут открыть возможности реализации одновременно неселективного ионного транспорта и селективного транспорта крупных заряженных молекул.

Еще одним немаловажным фактором, влияющим на транспортные характеристики нанопоры является ее форма. В модели идеальной цилиндрической поры, когда влиянием ДЭС на характеристики структуры можно пренебречь, электрическая проводимость определяется областью поры с наименьшей площадью сечения. Однако, если объектами исследования являются несимметричные относительно продольной оси нанопоры, их форму необходимо учитывать при расчете проводимости, транспортных и селективных свойств. Наиболее распространенным примером таких несимметричных структур являются поры с различными входными и выходными диаметрами $d1 < d2$, называемые коническими нанопорами (см. рисунок 6) [29].

Конические поры характеризуются неравномерным профилем ДЭС вдоль оси канала, что приводит к возникновению областей с различающимися транспортными свойствами. Частным случаем такой ситуации служит реализация селективного ионного транспорта в области d1 и неселективного транспорта в области d2 вследствие того, что перекрытие ДЭС происходит только в узкой области поры. Вольт-амперная характеристика (ВАХ) таких пор принимает

“диодоподобный” вид (см. рисунок 6 – г.), и означает наличие эффекта ионного выпрямления тока - ИВТ (ICR - ion current rectification).

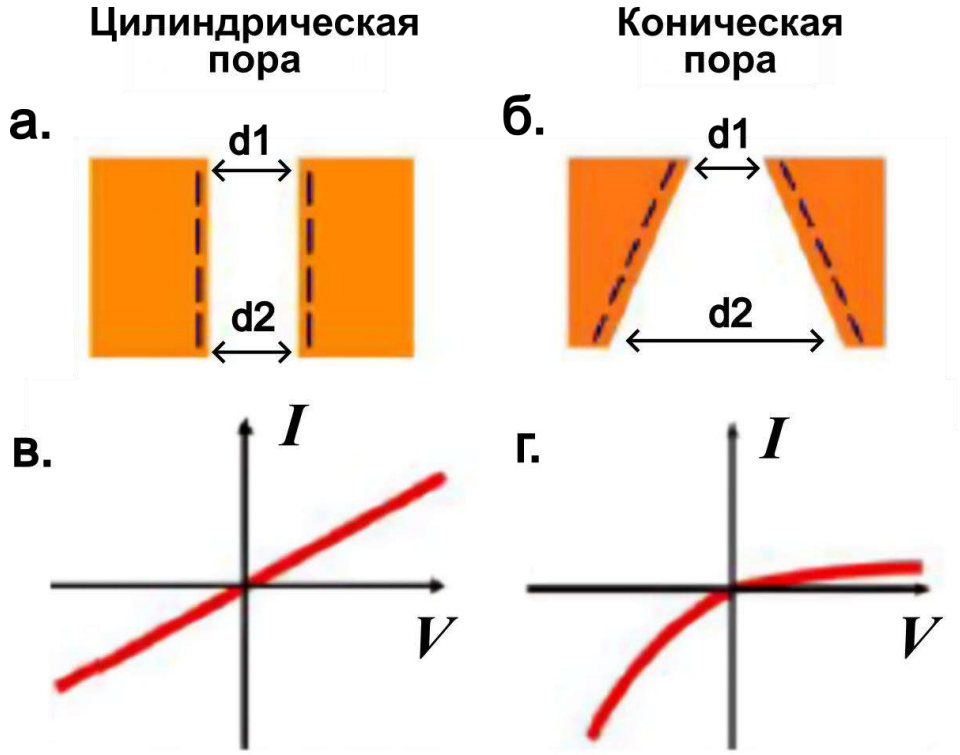


Рисунок 6 – а,б. Схематические изображения цилиндрической (слева) и конической (справа) нанопоры. в,г. Примеры ВАХ цилиндрической (слева) и конической (справа) нанопор. Отклонение от линейной зависимости ВАХ конической поры возникает вследствие эффекта ионного выпрямления тока.

Причиной возникновения эффекта ИВТ служит возникновение обогащенных и обедненных коинами областей внутри нанопоры при разных полярностях прикладываемого напряжения [30,31]. В случае конической форма поры и отрицательного поверхностного заряда ее стенок (как показано на рисунке 7), узкая область нанопоры проявляет селективные свойства к коионам (анионам), но свободно пропускает противоионы (катионы). При подаче к системе отрицательного потенциала, коионы, двигаясь к положительному электроду, накапливаются в узкой области, реализуя случай обогащения коионами внутреннего объема поры и росту ионного тока. В случае положительного приложенного потенциала, проникновение коионов в область поры затруднено, что приводит к случаю обеднения объема поры коионами и снижению ионного тока.

Хотя ИВТ является нежелательным эффектом в приложениях одномолекулярного детектирования, оно находит широкое применение в сенсорах, обеспечивающих селективное детектирования определенных веществ в малых концентрациях (но не на уровне отдельных молекул), подробнее о применении конических и иных видов нанопор рассказывается в разделе 1.4.

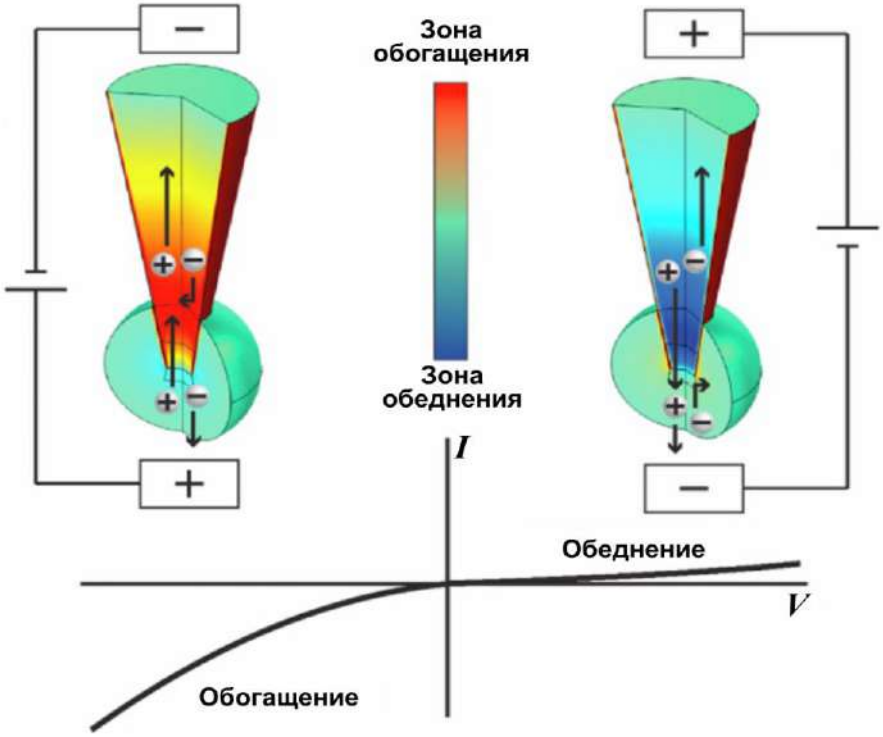


Рисунок 7 – Схематическое изображение механизма возникновения эффекта ИВТ в отрицательно заряженной конической нанопоре. Слева и справа представлены случаи обогащения и обеднения коионами области нанопоры, соответственно. На ВАХ представлена зависимость ионного тока конической поры от приложенного напряжения, левая ветвь соответствует случаю обогащения коионами объема нанопоры, правая ветвь - случаю обеднения.

Правильная интерпретация результатов нанопоровых измерений требует четкого представления о структурных и физико-химических характеристиках используемых нанопор, которые зачастую трудно определить стандартными методами характеризации наноразмерных структур (ПЭМ, АСМ, СЭМ и т.д.). Так, большое количество информации о свойствах используемой нанопоровой структуры можно получить из параметров, получаемых при измерении ионного

тока. К ним относятся: эффективный диаметр нанопоры; электрическая проводимость нанопоры; форма ВАХ; стабильность ионного тока поры при длительных измерениях в потенциостатическом режиме (фиксированной разности потенциалов). Величина электрической проводимости, как уже говорилось ранее, позволяет делать выводы о размерах нанопоры, а также конфигурации ДЭС. Тесно связанной с электрической проводимость является величина эффективного диаметра нанопоры $d_{эфф}$, используемая для сопоставления с экспериментальным диаметром поры, полученным с помощью ПЭМ, СЭМ, АСМ. Значительное расхождение эффективного и экспериментального диаметров сигнализирует о наличии факторов, влияющих на транспортные характеристики нанопоры. Наиболее распространенными причинами несоответствий экспериментального и эффективного диаметров являются загрязнение внутреннего объема поры и повреждение мембраны, приводящие к уменьшению и увеличению $d_{эфф}$, соответственно. Несимметричность (нелинейность) ВАХ указывает на возникновение эффекта ИВТ благодаря несимметричной форме или наличию загрязнений на входе или выходе нанопоры. Измерение ионного тока через пору в потенциостатическом режиме позволяет делать выводы о чистоте используемого буферного раствора, что чрезвычайно важно в экспериментах по одномолекулярному детектированию. Так, наличие в буферном растворе загрязнений (например, нежелательных молекулярных соединений) будет выражаться в присутствии на регистрируемом сигнале значительных по амплитуде отклонений от значения тока открытой поры $I_0$, соответствующих взаимодействию молекул загрязнителя с нанопорой. Приложения одномолекулярного детектирования накладывают на нанопоровую систему ряд требований, без соответствия которым анализ получаемых в результате измерений данных будет затруднен или вовсе невозможен. К этим требованиям относятся: схожие транспортные характеристики на всех участках поры – что означает линейную ВАХ (отсутствие эффекта ИВТ); совпадение реального и расчетного диаметров поры; стабильность нанопоровой структуры и чистота раствора, что выражается в стабильном уровне ионного тока при потенциостатических измерениях.

## 1.3 Принцип нанопорового детектирования и фиксации одиночных молекул

Несмотря на большое разнообразие нанопоровых систем, основным механизмом детектирования (и анализа) аналита является регистрация изменений уровня ионного тока, возникающих при прохождении через пору молекулярных соединений. Данный метод – метод электрического нанопорового детектирования является развитием принципа Коултера и позволяет обнаруживать объекты (молекулы), с диаметром сравнимым с диаметром поры (справедливо для представления молекул как единичных или последовательно соединенных цилиндров). Важно отметить, что ограничения на размер исследуемых с помощью нанопор объектов определяются соотношением сигнал\шум. Для технологий твердотельных нанопор, позволяющих гибко подбирать размеры формируемых структур, характерные диаметры детектируемых молекул лежат в диапазоне 1 - 100 нм, что закрывает практически все возможные потребности детектирования наноразмерных объектов.

Как говорилось ранее, в чистом буферном растворе электролита нанопоровая система характеризуется постоянным во времени уровнем ионного тока – током открытой поры $I_0$. При добавлении в cis- объем измерительной ячейки молекул исследуемого вещества, процесс одномолекулярного нанопорового детектирования можно разделить на 3 этапа: броуновское движение молекул в объеме раствора; направленное движение молекул в области захвата нанопоры под действием внешних сил; прохождение молекул через внутренний объем нанопоры (см. рисунок 8) [32]. Основные требования, накладываемые на молекулярные соединения для исследования в нанопоровом сенсоре, заключаются в удовлетворении стерическому механизму фильтрации (диаметр молекул не должен быть больше диаметра поры), а также отсутствии адгезии между исследуемыми молекулами, нанопоровой мембраной и поверхностью измерительной ячейки (cis- и trans- объемов).

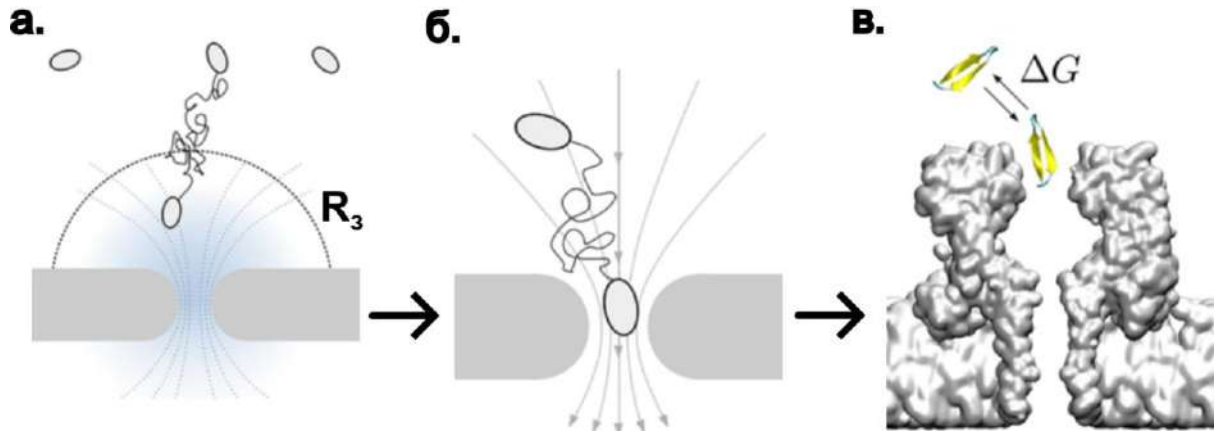


Рисунок 8 – Последовательность этапов процесса транспорта одиночной молекулы вещества через одиночную нанопору. а. Попадание одиночной молекулы в область захвата поры $R_з$ вследствие броуновского движения в объеме электролита. б. Направленное движение одиночной молекулы к нанопоре под действием внешних сил, действующих в области захвата $R_з$. в. Проникновение одиночной молекулы непосредственно во внутренний объем нанопоры после преодоления потенциального барьера ΔG.

Броуновское движение молекул исследуемого вещества в объеме раствора обусловлено геометрией и температурой электролита в объемах нанопорового сенсора. При приложении внешних движущих сил, нанопора действует подобно воронке, концентрируя поле внешних сил в своем внутреннем объеме и областях, находящихся в непосредственной близости от входа и выхода в нанопору. Такие области (области захвата) характеризуются радиусом захвата $R_з$ (см. рисунок 9 – а.), внутри которого приложенные к системе внешние силы (эл. поле, градиент давления, температуры и.т.д.) оказывают влияние на исследуемые молекулы. Вне областей захвата, поля приложенных сил крайне разрежены и не оказывают существенного влияния на динамику молекул вне зависимости от их физико-химических свойств. Поведение молекул в объеме раствора подчиняется броуновскому движению, из чего следует что вероятность попадания исследуемых молекул в область захвата нанопоры зависит от их концентрации в буферном растворе электролита и температуры.

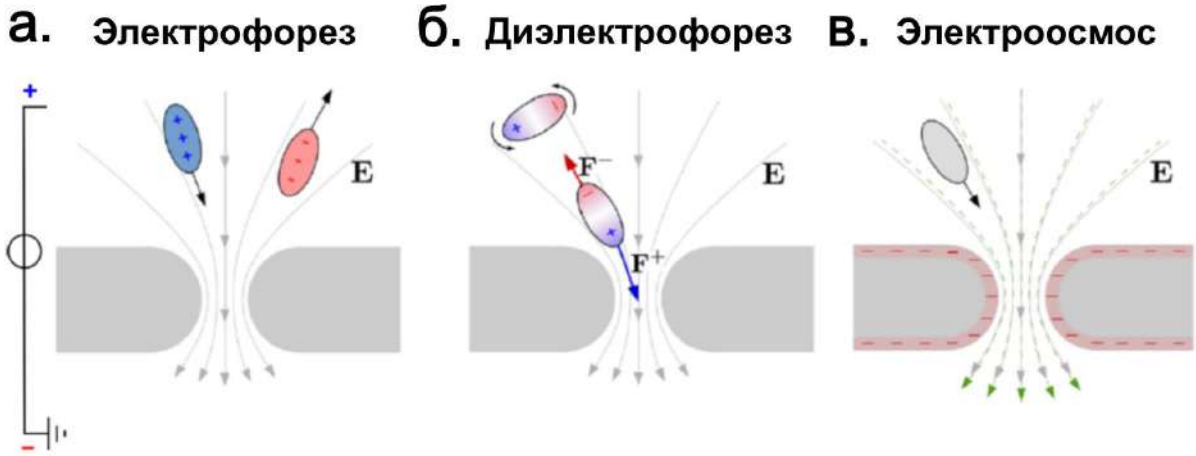


Рисунок 9 – Основные механизмы электрического транспорта молекул в нанопоровых системах. а. Заряженные частицы движутся по градиенту приложенного электрического поля под действием электрофореза. б. Частицы с индуцированным дипольным моментом ориентируются по градиенту электрического поля и движутся к области нанопоры под действием диэлектрофореза. в. Электронейтральная частица захватывается потоком молекул растворителя и движется к области поры под действием электроосмотического потока.

При попадании молекулы исследуемого вещества в область $R_з$, на нее начинают оказывать влияние приложенные к системе силы, осуществляя направленный транспорт захваченных молекул к нанопоре (или от неё, при противоположном направлении действующих на молекулу сил). Направленный транспорт захваченных молекул может быть осуществлен с помощью различных механизмов, наиболее распространенным из которых является приложенное электрическое поле (электрический механизм транспорта). Распространенность электрического поля для транспорта молекул обусловлена тем, что в большинстве нанопоровых сенсоров электрическое поле используется для проведения электрохимических измерений. Электрический транспорт заряженных молекул, а также молекул с индуцированным дипольным моментом, осуществляется с помощью электрофореза и диэлектрофореза соответственно, как показано на рисунке 9 – а,б.

В случае электрофореза, заряженная молекула движется в направлении градиента электрического поля из cis- объема электролита в trans- объем. Изменяя полярность эл поля, можно управлять направлением движения заряженных молекул, реализуя селективный транспорт. В случае диэлектрофореза, индуцированный дипольный момент молекулы поворачивает ее вдоль направления вектора градиента электрического поля, осуществляя движение молекулы к поре при любой полярности напряжения. Электро- и диэлектрофорез позволяют гибко управлять скоростью движения молекул в области захвата поры и непосредственно во внутреннем объеме поры с помощью изменения величины прикладываемого к системе напряжения.

Скорость движения частицы (молекулы) может быть записана как:

$$\nu = \mu F_{\text{внешн}} \tag{11}$$

где $\mu$ - подвижность частицы, $F_{\text{внешн}}$ - внешняя сила, действующая на частицу (в данном случае электрическое поле). Электроферетическая $F_{\text{эф}}$ и диэлектрофоретическая $F_{\text{дф}}$ составляющие внешней силы будут задаваться следующими отношениями:

$$F_{\text{эф}} = -\frac{qI}{2\pi\sigma r^2} \tag{12}$$

$$F_{\partial\phi} = -\frac{p|I|}{4\pi\sigma r^3} \tag{13}$$

где I - величина нанопорового ионного тока, $\sigma$ - проводимость поры, r - расстояние от входа в пору до частицы, q - заряд частицы, p - наведенный дипольный момент частицы. Из формул (12,13) следует что направление $F_{\text{эф}}$ зависит от знаков q и I, в то время как $F_{\text{дф}}$ всегда направлено в сторону поры. Недостатком описанных механизмов является сложность транспортировки слабо заряженных молекул и/или молекул с относительно большой массой из-за слабого влияния электрического поля на их динамику. Определенные трудности могут возникнуть и при работе с биологическими молекулами сложной структуры (например, крупных белковых комплексов), поскольку определение суммарного поверхностного заряда таких молекул и их конформационной конфигурации может оказаться трудной задачей.

В случае электронейтральных молекул без наведенного дипольного момента, электрический транспорт может реализовываться посредством потока электроосмоса. Явление электроосмоса заключается в генерации потока буферного раствора (растворителя), вызванного направленным движением ионов ДЭС под действием электрического поля как показано на рисунке 9 – в. Направление и скорость генерируемого потока зависят как от приложенной к системе разности потенциалов, так и от конфигурации ДЭС (величины поверхностного заряда стенок нанопоры и концентрации электролита). Таким образом, электроосмотический поток (поток растворителя) способен захватывать и осуществлять направленный транспорт электронейтральных молекул. В определенных конфигурациях нанопорвых систем, электроосмотический поток способен осуществлять захват и перенос заряженных молекул против сил электрофореза (или диэлектрофореза). Скорость электроосмотического потока на расстоянии r от входа в пору (но внутри области захвата), при отсутствии внешних сил кроме приложенного электрического поля, может быть записана как:

$$\nu_{эо} = -\frac{Q_{эо}}{2\pi r^2} \tag{14}$$

где $Q_{эо}$ - объемный расход жидкости, который в первом приближении задается отношением:

$$Q_{эо} = G_{эо}\Delta V \tag{15}$$

где $G_{эо}$ - электроосмотическая проводимость, $\Delta V$ - приложенное к системе напряжение. Учитывая, что силы электрофореза (диэлектрофореза) могут быть как сонаправлены, так и противонаправлены относительно друг друга в зависимости от свойств нанопоровой системы, сумма сил, действующих на частицу (молекулу) в области захвата нанопоры может быть выражена через эффективный потенциал U(r):

$$U(r) = -\left[\frac{qI}{2\pi\sigma r} + \frac{p|I|}{8\pi\sigma r^2} + \frac{Q_{эо}}{2\pi\mu r}\right] \tag{16}$$

Стоит отметить, что формулы (12-14) справедливы для случаев сильных электролитов. Электрические механизмы транспорта хорошо совместимы с

биологическими молекулами, поскольку величина напряженности электрического поля в нанопоровой системе может быть сравнима с напряженностью поля, возникающему благодаря трансмембранному потенциалу клетки [33].

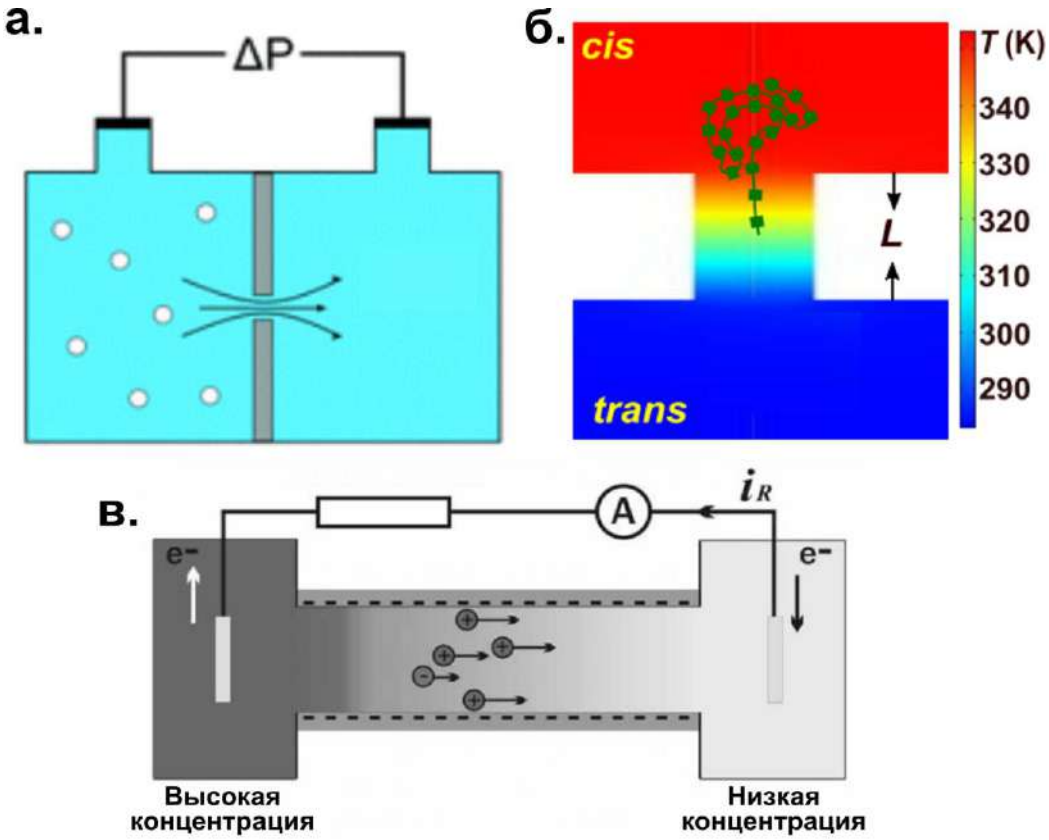


Рисунок 10 – Различные механизмы транспорта, применяемые в нанопоровых системах. а. Движение молекул растворителя под действием градиента давления. б. Движение молекулы ДНК через нанопору в результате ее захвата термодиффузионным потоком. в. Направленное движение ионов в область с низкой концентрации электролита.

Менее распространенными механизмами молекулярного транспорта через одиночную нанопору являются градиенты температуры, давления и концентрации ионов электролита. Суть данных механизмов заключается в создании различающихся условий в cis- и trans- объемах электролита, в результате чего индуцируется поток жидкости, направленный на восстановление равновесных условий в системе.

Транспорт под действием градиента давления представляет собой поток буферного раствора и молекул исследуемого вещества из области высокого

давления в направлении области низкого давления (см. рисунок 10 – а.) [34]. Таким образом, градиент давления обеспечивает эффективное направленное движение молекул вне зависимости от их свойств и часто используется в комплексе с электрическими методами управления молекулярным транспортом. Реализация данного метода облегчается доступностью разнообразных прецизионных контроллеров давления, широко применяемых в микрофлюидных системах. Однако, в силу хрупкости некоторых видов мембран, данный подход может быть затруднительно использовать на практике в определенных нанопоровых системах. Градиент давления может использоваться для экспериментальной оценки электрофоретических сил, действующих на заряженные объекты, а также как дополнительный инструмент управления транслокационной динамикой исследуемых молекул [35].

Температурный механизм (термоосмос) генерирует поток жидкости, направленный в область с низкой температурой благодаря возникновению конвективных потоков (см. рисунок 10 – б.) [36]. Таким образом, термоосмос во многом аналогичен градиенту давления, и может осуществлять транспорт как заряженных, так и электронейтральных частиц. К недостаткам термоосмотического метода относится необходимость интеграции системы термоконтроля во внутренний объем электрохимической ячейки, а также возможное возникновение паразитных электрических шумов в процессе работы системы контроля температуры. Также, к недостаткам данного метода можно отнести сложности в работе с чувствительными к температуре веществами (в первую очередь с биологическими молекулами), демонстрирующими изменение своих структурных свойств даже при небольших изменениях температуры. Объемный нагрев буферного раствора и локальный нагрев мембраны в области поры часто приходится учитывать в системах, включающих оптические методы воздействия на исследуемые молекулы. Воздействие высокоинтенсивного лазерного излучения может привести к локальному разогреву среды на несколько десятков градусов, оказывая влияние на значение как на уровень нанопорового ионного тока, так и на характеристики транспорта исследуемых молекул аналита.

Особенное внимание должно быть уделено порам с интегрированными плазмонными структурами (плазмонным нанопорам), эффективно рассеивающим тепло в окружающее пространство при возбуждении в них плазмонного резонанса [37,38].

Транспорт молекул под действием градиента концентрации электролита (диффузионный механизм), подобно электроосмосу, формирует направленный поток ионов, увлекающий за собой молекулы растворителя и молекулы исследуемого вещества (см. рисунок 10 – в.) [39]. Из-за сильного влияния на уровень ионного тока, а также воздействия на селективные свойства ионного и молекулярного транспорта, диффузионный механизм не находит широкого распространения в одиночных нанопорах (в отличии от пористых мембран). Тем не менее, градиент концентрации используется в исследованиях по управлению эффектом ИВТ и поверхностным зарядом в конических и цилиндрических порах [40,41], а также для модуляции транслокационной динамики биологических молекул [42]. Поскольку диффузионный механизм играет ключевую роль в регуляции параметров жизнедеятельности клеток, его исследование является важным фактором в биомиметических приложениях нанопоровых сенсоров.

Наконец, для проникновения во внутренний объем поры, детектируемая молекула должна преодолеть потенциальный энергетический барьер на входе в пору (см. рисунок 11 – а.) [43]. Потенциальный барьер складывается из: сил электростатических и химических взаимодействий детектируемой молекулы с поверхностью поры и ДЭС; внешних сил, прикладываемых к системе; конформационных конфигураций молекул, которые могут препятствовать их транспорту через пору [44]. Электростатическая составляющая потенциального барьера складывается из сил отталкивания (или притягивания) детектируемых молекул от заряженных стенок нанопоры и противоионов ДЭС в случае реализации селективного по заряду транспорта, а также уровня pH буферного раствора. Совокупность этих факторов может существенно влиять на процесс транслокации молекул через пору (см. рисунок 11 – б.) [45,46].

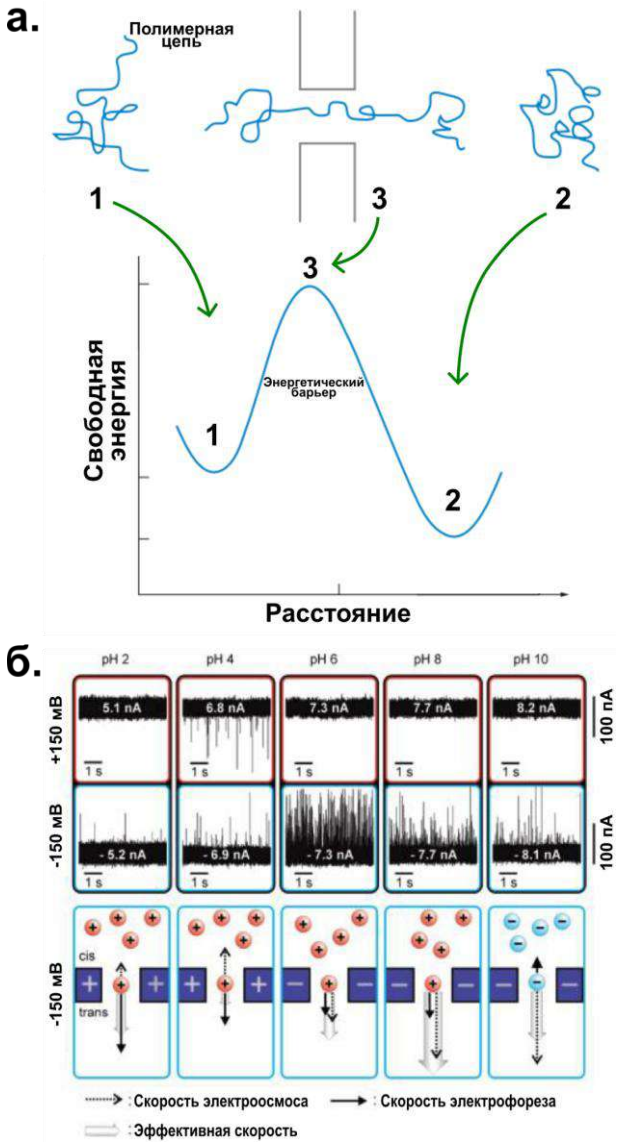


Рисунок 11 – а. Условное изображение трех этапов процесса транслокации (сверху) и соответствующие этим этапам значения потенциальной энергии энергетического барьера (снизу). Максимальное значение энергетического барьера соответствует случаю проникновения исследуемой молекулы непосредственно во внутренний объем поры. б. Зависимости нанопорового ионного тока от времени при U = ± 150 мВ и различных уровнях pH буферного раствора при наличии в cis- объеме ячейки молекул белка авидина (сверху). Схематическое изображение действующих на молекулы авидина электрофореза, электроосмоса, а также эффективная скорость этих молекул.

Химическое взаимодействие детектируемых молекул с поверхностью мембраны/стенок нанопоры (адгезия) также может помешать транслокации

молекул через пору. Аналогичным образом влиять на транслокацию могут и конформационные (или ориентационные) ограничения, заключающиеся в том, что лишь некоторые конфигурации пространственного положения молекул позволяют им проходить во внутренний объем поры. Распространенный пример - длинные молекулы ДНК, которые не могут проходить через пору в свернутом состоянии (в форме глобул) из-за стерических ограничений [44].

После преодоления потенциального барьера, детектируемые молекулы проходят через пору, частично перекрывая ее внутренний объем, тем самым вызывая скачкообразное изменение уровня ионного тока. Данное изменение (сигнал), соответствует транслокации (перемещению) молекулы через пору. Пример сигнала транслокации представлен на рисунке 12 [47]. После прохождения молекулы через пору, величина ионного тока возвращается от уровня транслокации $I_т$ к уровню открытой поры $I_0$. Таким образом, каждый сигнал транслокации соответствует прохождению отдельной молекулы (в случае если временной промежуток между транслокациями позволяет различить их как отдельные события). Кроме регистрации факта прохождения молекулы через пору, сигнал транслокации содержит в себе информацию о физико-химических характеристиках молекулы, открывая широкие возможности по анализу детектируемых молекул.

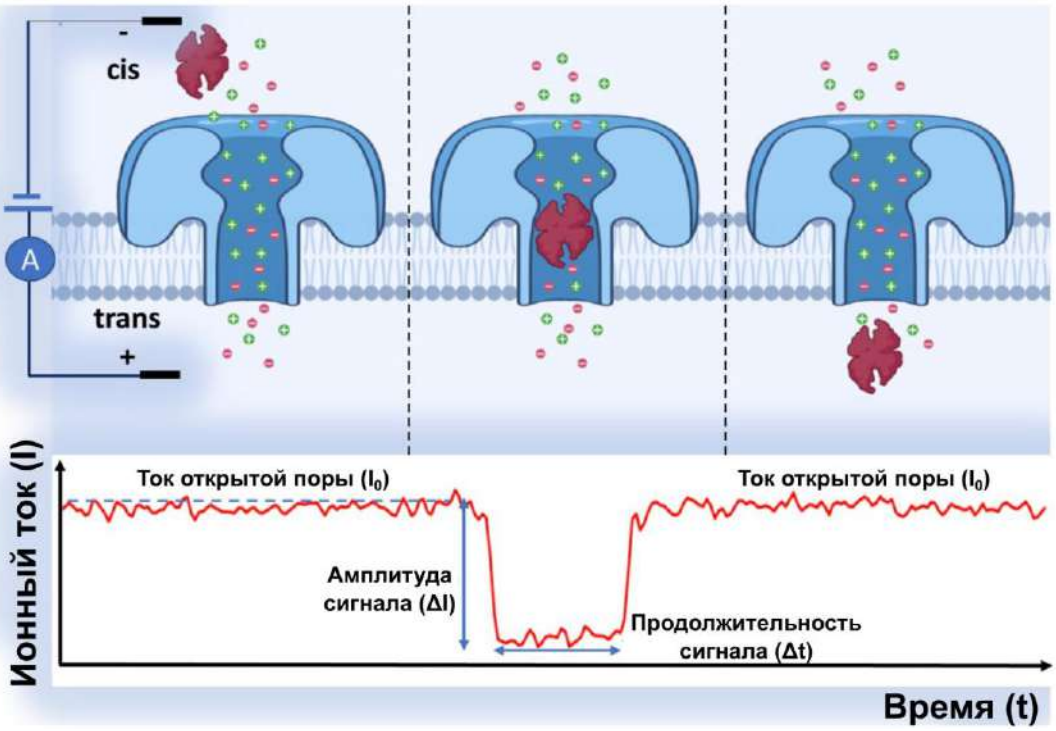


Рисунок 12 – Схематическое изображение процесса транслокации крупной молекулы через одиночную нанопору (сверху) и соответствующий этому процессу сигнал транслокации на зависимости ионного тока от времени (снизу).

К числу характеристик молекулы, оказывающих влияние на транслокационный сигнал, относятся: размеры, форма и конформационная конфигурация; величина поверхностного заряда; деформируемость структуры; наличие гидрофобных/гидрофильных областей. Наибольшее влияние на характеристики сигнала транслокации оказывают размеры детектируемых молекул. Как показано на рисунке 13 – а., чем больше площадь поперечного сечения молекулы, тем большей будет амплитуда сигнала $\Delta I = |I_t - I_0|$ [48–50]. Поскольку амплитуда сигнала зависит от объема исключенной из нанопоры жидкости, нанопоровый сенсор не способен детектировать каркасные или пористые структуры (см. рисунок 13 – б.) [51]. Эта особенность находит применение в случаях, когда каркасные структуры используют как транспортные молекулы для детектирования пришитым к ним молекулам. На характеристики сигнала также влияет и длина молекулы - чем она больше, тем продолжительнее

будет сигнал. Из этого следует, что наибольшее пространственное разрешение детектирования обеспечивается порами с наименьшей длиной.

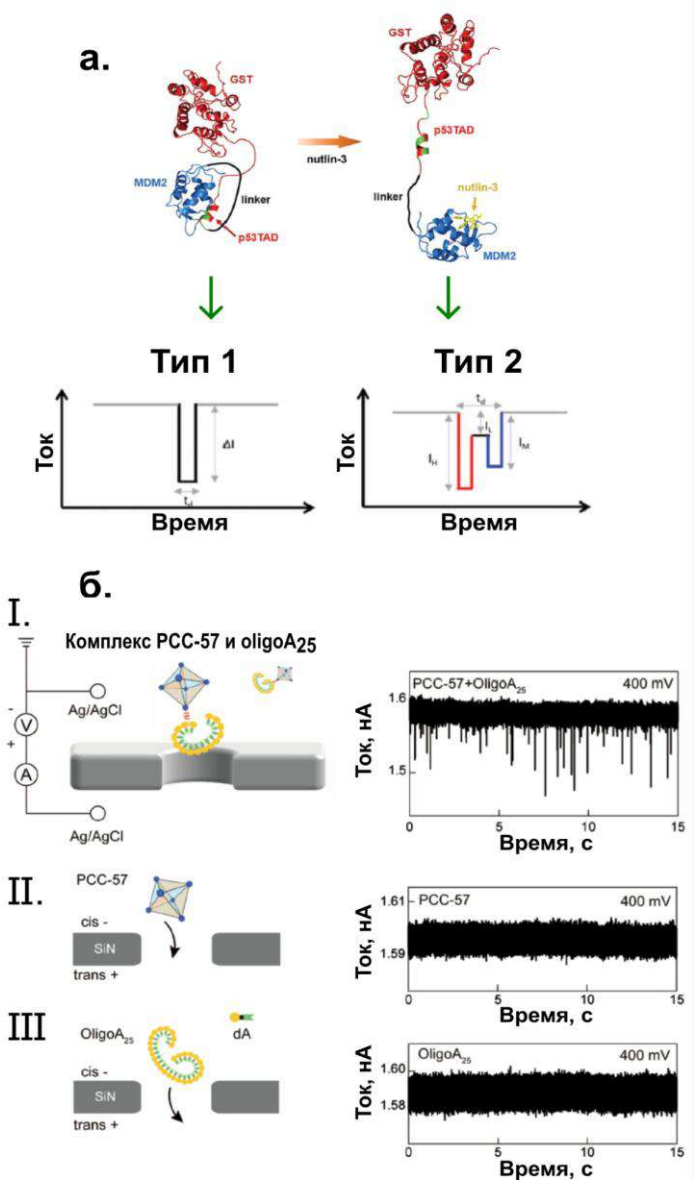


Рисунок 13 – а. Слева - схематическое изображение биомолекулы в компактной глобулярной конформации (тип 1) и ее сигнал транслокации, характеризующийся единичным пиком; справа - изображение молекулы в развернутой гантелеподобной конформации (тип 2) и ее сигнал транслокации, характеризующийся наличием двух пиков, соответствующих крупным субъединицам в начале и конце структуры. б. I - схематическое изображение транслокации комплекса каркасной молекулы и олигонуклеотида у входа в нанопору (слева), а также последовательности транслокационных событий таких комплексов (справа); II, III - изображения каркасных молекул и олигонуклеотидов

(слева) а также последовательности транслокационных событий этих молекул (справа), демонстрирующие что нанопоровая система не способна обнаружить эти молекулы по отдельности.

Следующим фактором, влияющим на транслокационный сигнал является форма детектируемой молекулы. Форма молекулы влияет на уровень ионного тока при транслокации $I_т$, что в случае молекулы сложной формы приводит к формированию многоуровневого сигнала, коррелирующего с профилем молекулы. Как показано на рисунке 13 – а., молекула гантелеобразной формы формирует трехуровневый сигнал. Неравномерное распределение поверхностного заряда молекулы также влияет на уровень нанопорового ионного тока, а также может влиять на ориентацию молекул во внутреннем объеме поры [33]. Однако, сложное взаимодействие ДЭС стенок поры и локального заряда молекулы зачастую требует использования методов молекулярной динамики (МД) для получения возможности сопоставления формы сигнала транслокации с моделью распределения заряда исследуемой молекулы. Измерение деформируемости структуры детектируемых молекул по сигналу транслокаций является часто используемым инструментом в приложениях по изучению свойств белковых молекул в различных конформационных конфигурациях, а также при их связывании с другими молекулами. Так, в работе [52] исследовалась транслокационная динамика молекул T7 РНК полимеразы и комплексных молекул, состоящих из T7 РНК полимеразы и молекулы ДНК длиной 22 пары оснований (п.о.). Полученные гистограммы распределения числа транслокаций от их амплитуды, представленные на рисунке 14 – а., позволяют рассчитать значения ширины на полувысоте (полуширины) для данных распределений. Большее значение полуширины для комплекса (0.21) в сравнении с одиночными молекулами полимеразы (0.179) указывает на то, что комплексные молекулы обладают более компактной и менее деформируемой структурой. Еще одним примером чувствительности нанопоровых систем является способность обнаруживать гидрофобные области при изменениях конформационных конфигураций биологических молекул (например, молекул β -

шпилек) [53]. Как видно из рисунка 14 – б., полностью развернутая конфигурация молекулы (номер 4) оказывает наибольшее влияние на амплитуду сигнала, так как гидрофобная область исключает из поры дополнительный объем буферного раствора. Молекулы β - шпильки не совершают процесс транслокации через нанопору, но некоторое время находятся в ее внутреннем объеме благодаря связи с крупной молекулой стрептавидина, не имеющей возможности к транслокации благодаря стерическому ограничению. Подобное удержание исследуемой молекулы в области нанопоры является одним из методов фиксации одиночных молекул в области одиночных нанопор.

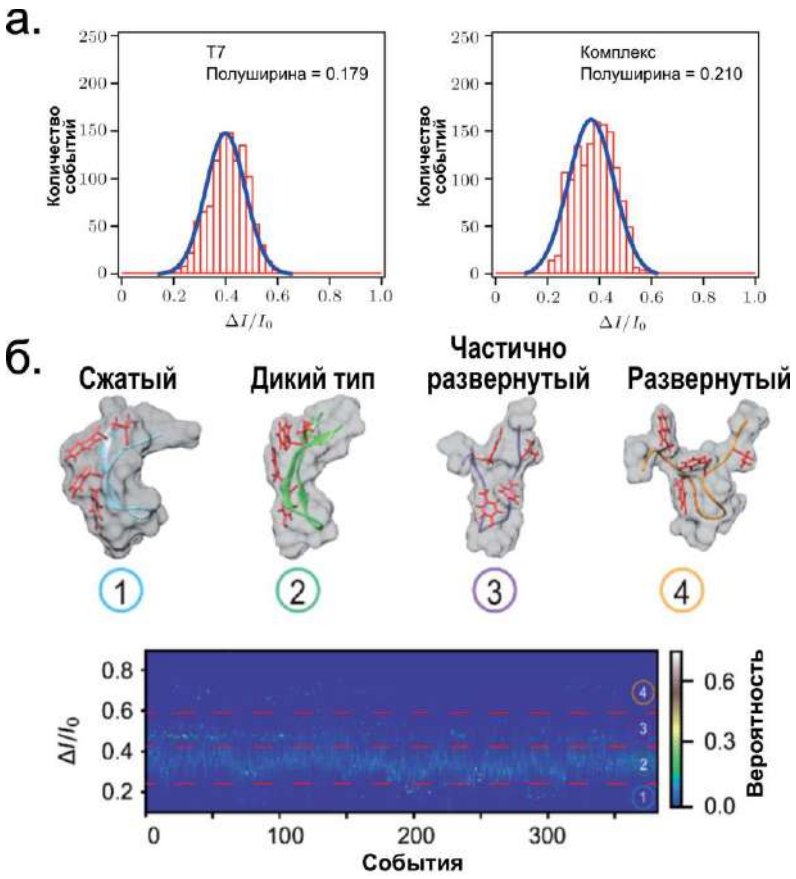


Рисунок 14 – а. Гистограммы распределения транслокаций по их амплитудам для молекул T7 РНК полимеразы (слева) и комплекса T7 РНК полимераза + двухцепочечная молекула ДНК (справа). Синими кривыми обозначены Гауссовы распределения. Текстовые вставки соответствуют значениям полуширины для представленных распределений. б. Четыре возможные конформации молекулы β - шпильки (сверху), а также распределение амплитуды ионного тока для более чем 300 событий переходов между конформационными конфигурациями (снизу).

Гистограмма разделена на 4 части (красные пунктирные линии), каждая из которых соответствует конформации под тем же номером.

Стоит отметить, что эффективный анализ сигналов транслокации возможен только в случае, когда последовательные сигналы транслокации не накладываются друг на друга. При этом, время захвата молекулы $\tau_з$, когда она движется из объема раствора ко входу в нанопору, много больше времени входа $\tau_в$, необходимое молекуле для преодоления потенциального барьера и проникновению во внутренний объем поры. Такой случай транслокационной динамики молекул: $\frac{\tau_з}{\tau_в} \gg 1$, называется режимом ограниченным по транспорту, в то время как обратный случай: $\frac{\tau_з}{\tau_в} \ll 1$, называется режимом ограниченным по потенциальному барьеру [32]. Вариант ограничения по транспорту представляется предпочтительным для экспериментов по одномолекулярному детектированию, поскольку предотвращает возможное накопление детектируемых молекул в области захвата нанопоры. Эффект накопления молекул может приводить к паразитным изменения тока из-за взаимодействия молекул с поверхностью мембраны и поры [54], появлению многоуровневых сигналов транслокаций в случае практически одновременной транслокации нескольких молекул, а также адгезии молекул к поверхности мембраны или стенок поры.

Кроме регистрации и анализа транслокационных сигналов, принцип нанопорового детектирования можно применить для исследования динамики зафиксированных молекул в реальном времени. В отличие от детектирования транслокационных событий от множества молекул, последовательно проходящих через пору, данный метод подразумевает работу с одним единственным объектом (молекулой) посредством ее фиксации в области нанопоры в течении длительного промежутка времени. Перемещение молекулы в область нанопоры (перед ее фиксацией) осуществляется уже описанными методами молекулярного транспорта, наиболее удобным из которых является приложенное электрическое поле. После доставки в область нанопоры, молекула фиксируется у входа в нанопору за счет стерического механизма - диаметр молекулы должен быть больше

диаметра поры. Наличие зафиксированной молекулы у входа в нанопору влияет на ионный транспорт аналогично процессу транслокации, сопровождаясь большим по длительности изменением ионного тока $I_ф$ (ток фиксации). Изменения свойств зафиксированной молекулы влияют на уровень тока $I_ф$, открывая возможность исследования динамики молекул в реальном времени. Таким образом, метод фиксации одиночных молекул может быть полезен при исследовании: переходов белковых молекул между конформационными состояниями; изменений свойств молекулы вследствие взаимодействия с активным веществом; динамики функциональной активности белков (катализ, протеолиз и т.д.). К достоинствам данного метода относится возможность работы с одной единственной зафиксированной молекулой, а также продолжительность исследования молекулы - до сотен секунд (строго говоря продолжительность процесса фиксации молекулы в поре может быть неограниченной). По сравнению с конкурентными методами ((smFRET, крио-ЭМ, АСМ), метод фиксации позволяет исследовать молекулы без их предварительной химической модификации, исключая необходимость создания комплексов с другими молекулами или значительных физико-химических воздействий (иммобилизация на подложке, заморозка).

К общим недостаткам нанопоровых технологий относятся: низкое отношение сигнал/шум (в особенности для твердотельных пор); высокая скорость транслокаций молекул; большая длина пор (не относится к 2D и квази-2D мембранам). Все эти факторы негативным образом сказываются на пространственном разрешении детектирования, создают сложности с регистрацией и анализом сигнала от коротких молекул, а также накладывают дополнительные требования к измерительной системе. В большинстве случаев измерения ионных токов с величинами <100 нА, проводятся с частотой регистрации 1кГц - 100кГц. Сложности также представляет правильная интерпретация измеряемых сигналов. Не все регистрируемые сигналы могут означать успешные транслокации молекул. Молекулы могут воздействовать на ионный транспорт в области непосредственно у входа в нанопору, вызывая изменения ионного тока, отличающиеся от непосредственно транслокационного сигнала. Например, нахождение золотых

частиц у входа в кварцевую нанопору (нанопипетку) и во внутреннем объеме пипетки приводит к последовательному увеличению и уменьшению уровня ионного тока пипетки, соответственно (см. рисунок 15) [55].

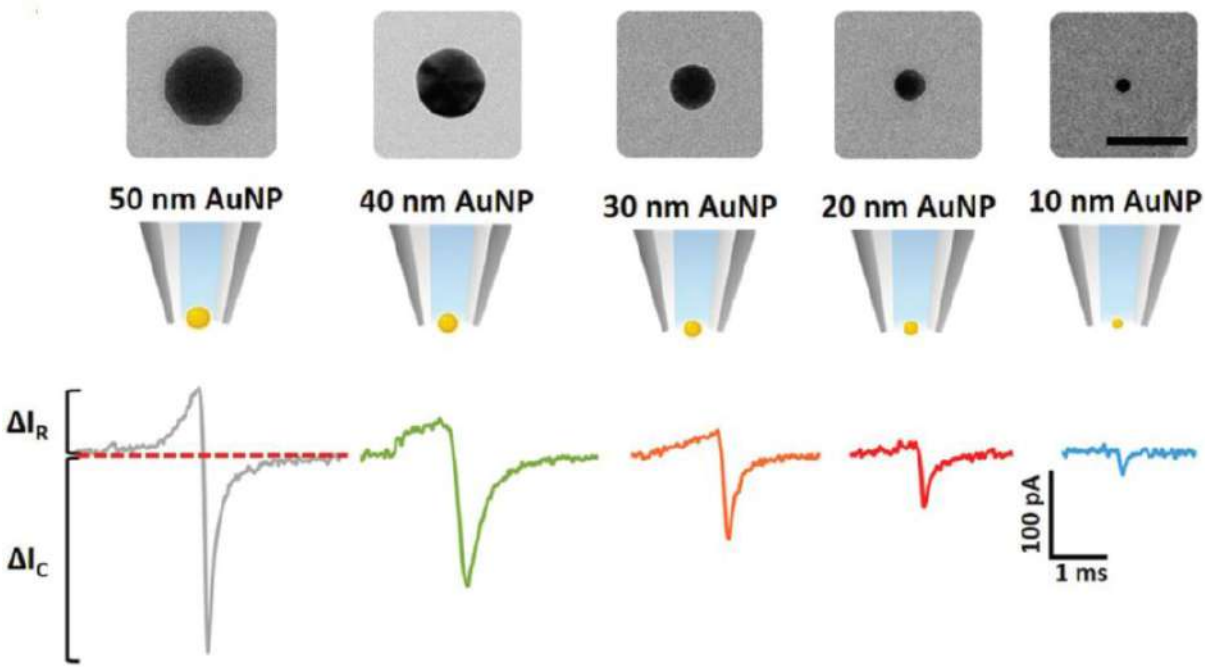


Рисунок 15 – Схематическое изображение Au наночастиц различного диаметра во внутреннем объеме кварцевой нанопипетки диаметром 60 нм (сверху), а также характерные сигналы транслокаций данных наночастиц через пипетку (снизу).

## 1.4 Виды твердотельных мембран, методы синтеза и применения нанопор

За последние два десятилетия активного развития нанопоровых технологий, было представлено большое количество материалов подходящих для синтеза тонких мембран с интегрированными нанопорами [24,56]. Наиболее распространенными из этих материалов являются мембраны на основе $SiN_x$ [57,58], кремниевые композитные мембраны ($Si/TiO_2$, $Si/HfO_2$, Si/Au) [59–61], пористые мембраны на основе металлов ($Al_2O_3$, MOF) [62,63], в также 2D и квази-2D мембраны (графен, MoS2, MXenes, COF) [25,64,65]. Примеры нанопоровых сенсоров на основе этих материалов представлены на рисунке 16.

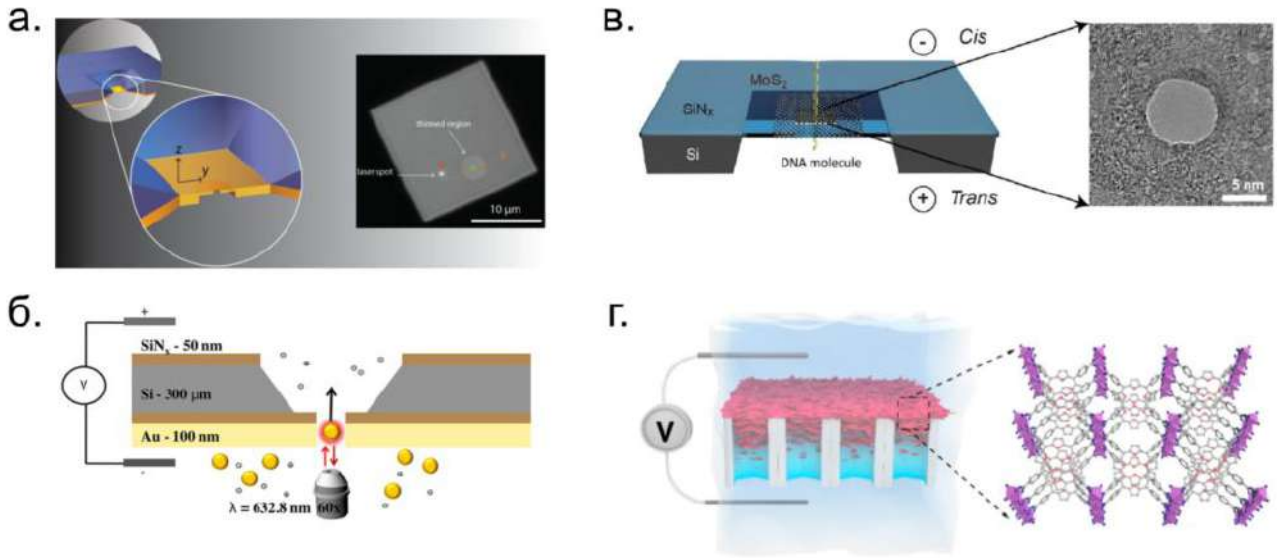


Рисунок 16 – а. Схематическое изображение образца содержащего свободно подвешенную $SiN_x$ мембрану с интегрированной одиночной нанопорой (слева) и оптическое изображение сформированной мембраны (справа), стрелкой указано расположение нанопоры. б. Схематическое изображение $Si/SiN_x/Au$ нанопорового образца, позволяющего проводить одномолекулярного детектирования методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). в. Схематическое изображение 2D мембраны $MoS_2$ установленной на $SiN_x/Si$ подложке (слева) и ПЭМ изображение области $MoS_2$ мембраны с интегрированной одиночной нанопорой (справа). г. Схематическое изображение образца нанофлюидного ионного диода, состоящего из массива каналов в пористой мембране с асимметричным распределением MOF - структур во внутреннем объеме каналов.

Нанопоры на основе кремния обладают хорошей химической стабильностью и большим потенциалом модификации поверхности [66,67], однако характеризуются низким пространственным разрешением детектирования вследствие большой длины (≳20 нм). 2D материалы позволяют создавать поры моноатомной длины [68], обеспечивая высочайшую чувствительность к детектируемым молекулам. Пористые мембраны (например, $Al_2O_3$) характеризуются узким распределением диаметров пор, что обеспечивает высокую пропускную способность. Такие структуры ограничивают применимость электрических методов измерений для одномолекулярного детектирования, а

также часто обладают низкой чувствительностью из-за большой толщины мембран [62].

Большое разнообразие материалов и возможных направлений применения привели к развитию нескольких технологий формирования одиночных нанопор в тонких твердотельных мембранах. Наиболее распространенной из которых является формирование поры сфокусированным электронным (TEM) или ионным (FIB) пучком. Данная технология позволяет точно контролировать размер пор (<1 нм) и их местоположение на мембране [38]. Менее прецизионными методами изготовления пор являются: химическое травление, интегрированное в процесс формирования мембран, но формирующее большие поры (>5 нм) [69]; контролируемый диэлектрический пробой (КДП) позволяющий формировать поры с контролируемым размером и величиной поверхностного заряда, но страдающий от невозможности позиционирования формируемой поры [70]. Сочетание метода диэлектрического пробоя и оптического воздействия лазерным излучением обеспечивает возможность контролируемого травления поры в области падения лазерного пучка с помощью величины приложенного потенциала и концентрации раствора электролита [71]. Атомно-слоевое осаждение (ALD) [72,73] является перспективным методом, используемым для покрытия поверхности мембран и осаждения слоев максенов (MXene), а также ковалентные органические каркасы (COF). Примеры различных методов формирования нанопоровых структур представлены на рисунке 17.

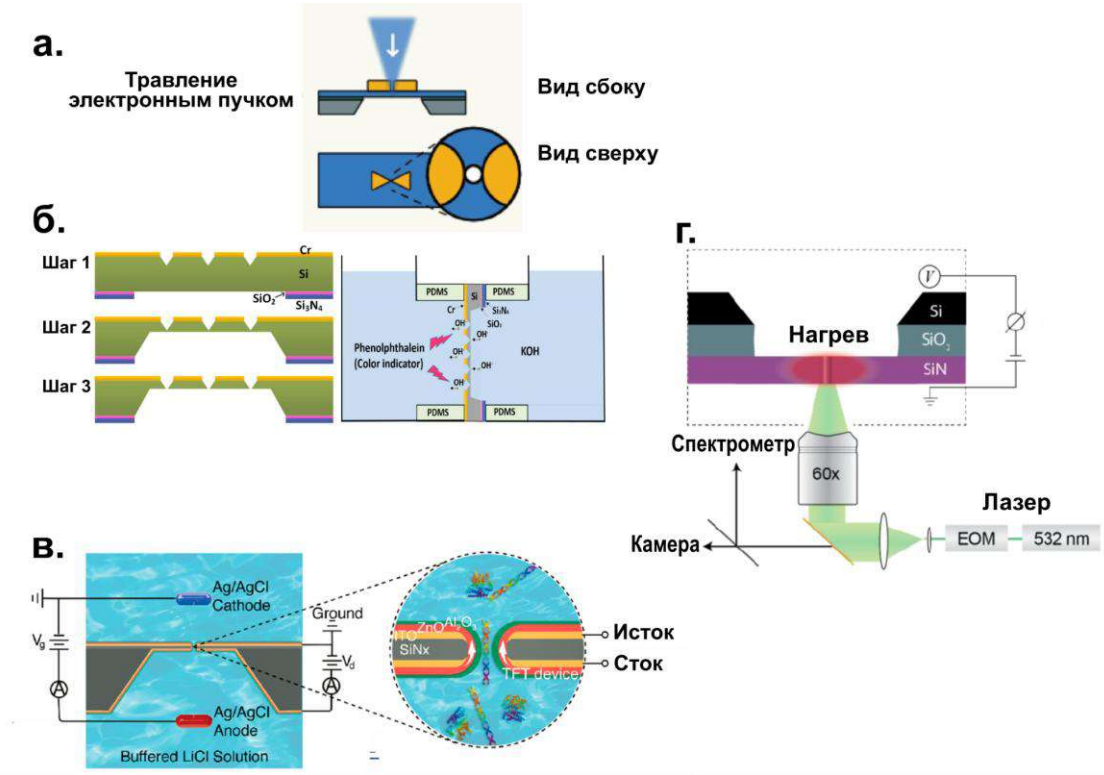


Рисунок 17 – а. Схематическое изображение формирования нанопоры в зазоре Au плазмонной антенны методом литографии сфокусированным электронным пучком в ПЭМ. б. Изображение стадий формирования массива Si нанопор заданной формы методом жидкостного травления (слева) и схему мониторинга процесса порообразования (справа), основанную на оптическим детектировании молекул красителя проходящих через новообразованные поры. в. Схематическое изображение композитной нанопоровой структуры SiN/ITO/ZnO/$Al_2O_3$, в которой слои ZnO/$Al_2O_3$ были сформированы методом ALD на поверхности готовой нанопоры. г. Экспериментальная установка для формирования одиночных нанопор методом лазерного КДП.

Как уже говорилось ранее, высокая чувствительность и селективность делают сенсоры на основе твердотельных нанопор передовым инструментом для детектирования и анализа отдельных молекул. Хотя секвенирование ДНК с использованием твердотельных нанопор еще не было продемонстрировано, несколько работ демонстрируют возможность детектирования отдельных нуклеотидов или реализации рекордно низкой скорости транслокаций молекул через пору [44,74]. Безметочное и неинвазивное детектирование одиночных

молекул активно используется для изучения белковых соединений [49,75], а также исследовании транслокационной динамики широкого класса биомолекул [76,77]. Активно развивающимися направлениями применения нанопоровых структур являются: изучение специфических механизмов связывания [50,78]; моделирование биологического трансмембранного транспорта [79,80]; преобразование энергии [81,82]; использование в качестве ионных диодов, транзисторов [83,84] и высокочувствительных сенсоров [85,86].

Особое внимание следует уделить плазмонным нанопорам представляющим собой структуру из одиночной нанопоры и расположенной вблизи нее плазмонной антенны. Основываясь на эффекте возбуждения поверхностного плазмонного резонанса, плазмонные антенны позволяют эффективно локализовать электрическое поле в приповерхностном слое мембраны и области нанопоры, влияя на её транспортные свойства. Плазмонные нанопоры являются передовым инструментом для исследования динамики транслокаций молекул [87–89], увеличения отношения сигнал/шум измеряемого сигнала нанопорового ионного тока [38], а также интеграции оптических схем измерения в нанопоровую систему [48,90]. Возможность управления свойствами плазмонных нанопор при помощи оптического излучения делает такие структуры полезными в приложениях исследования ионного транспорта в одиночных порах. Исходя из перечисленных достоинств, часть данной работы будет посвящена исследованию ионного транспорта в одиночных плазмонных нанопорах, а также разработкой методов оптического управления проводимостью таких структур.

# 2. Описание экспериментальных установок и методов

## 2.1 Формирование одиночных $SiN_x$ нанопор

Формирование тонких $SiN_x$ мембран с интегрированными одиночными нанопорами представляет многоэтапный процесс. На первом этапе, Si (100) пластина (подложка) двухсторонней полировки подвергается термическому отжигу в атмосфере кислорода для формирования слоя $SiO_2$ толщиной 100 нм. Слой $SiO_2$ необходим для устранения токов утечки через мембрану, а также лучшей адгезии следующего за ним слоя $SiN_x$, формируемого методом газофазного осаждения при пониженном давлении (Low pressure chemical vapor deposition – LP-CVD). Для синтеза $SiN_x$ слоев субмикронной толщины, используется реакция дихлорсилана ($SiCl_2H_2$) и аммиака ($NH_3$) при температуре 700 °C и давлении ~ 40 Па. Для достижения желаемого стехиометрического состава слоя ($Si_3N_4$) скорость потока аммиака должна быть в 3 раза выше, чем для дихорсилана [91]. Поскольку толщина слоя $SiN_x$ определяет длину нанопор, для достижения лучшей чувствительности сенсора она должна быть как можно меньшей, при этом не теряя своей механической прочности. Для экспериментов по управлению ионным транспортом в одиночных порах, были получены образцы с толщиной слоя $SiN_x$ ~ 40 нм, для экспериментов по детектированию и фиксации одиночных молекул, продолжительность ростового процесса была уменьшена, в результате чего удалось сформировать слой $SiN_x$ толщиной ~ 30 нм. Как показано на рисунке 18, слой $SiO_2$ формируется на обеих сторонах кремниевой подложки.

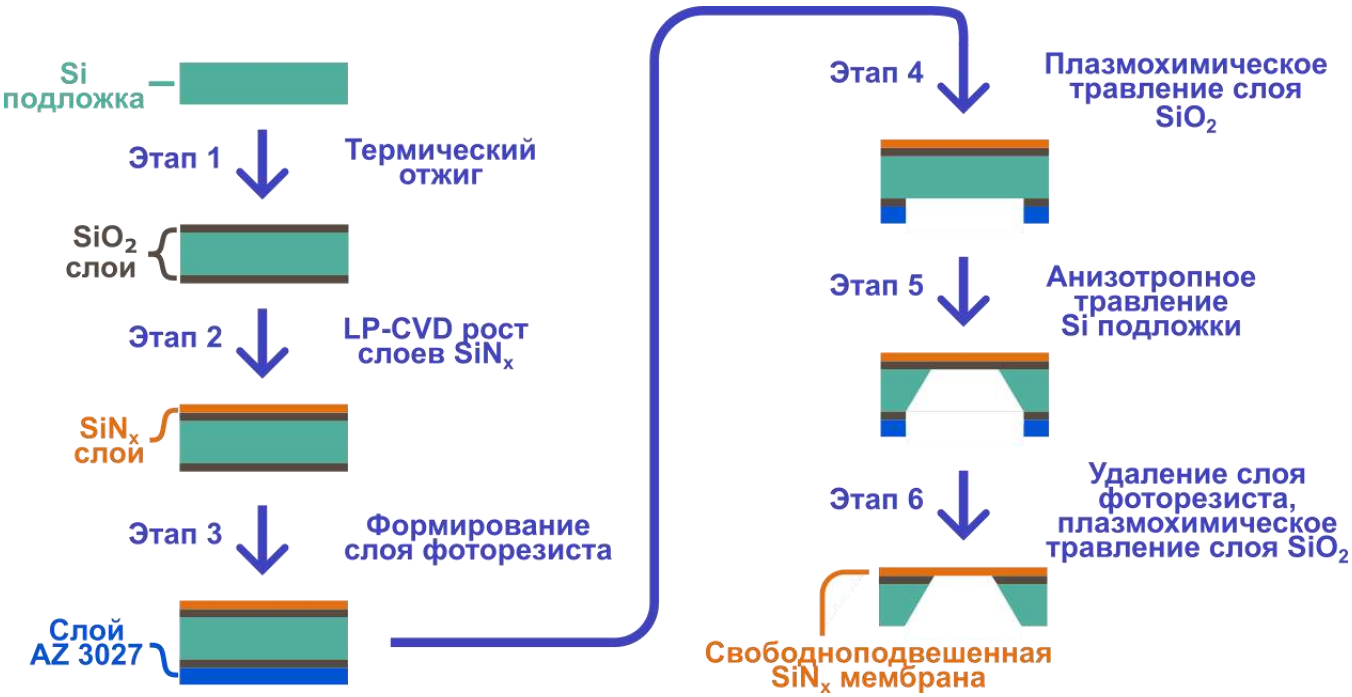


Рисунок 18 – Схематическое изображение ключевых этапов формирования свободноподвешенной $SiN_x$ мембраны.

На следующем этапе, с тыльной стороны пластины наносится слой фоторезиста AZ 3027. Фоторезист наносится методом центрифугирования, экспонируется и проявляется по стандартной процедуре согласно инструкции (этап 3 на рисунке 18). Далее, методом плазмохимического травления (рабочий газ CF4) производится удаление слоя $SiN_x$ в экспонированных областях. Используя оставшиеся области тыльного слоя $SiN_x$ в качестве маски (этап 5 на рисунке 18), локальная область кремниевой пластины удаляется методом жидкостного анизотропного травления. В качестве травителя используется KOH 20%, процесс проходит при температуре 85 °C, в течении ~ 4 ч. Результатом описанных процедур является формирование свободноподвешенной мембраны $SiN_x$ на лицевой стороне пластины как показано на рисунке 18, этап 6. Размеры свободноподвешенных мембран используемых в экспериментах по управлению ионным транспортом составили ~ 30*30 мкм, в экспериментах по детектированию и фиксации одиночных молекул составила ~ 80*80 мкм. Разница в размерах мембран обусловлена различиями масок фоторезиста. Благодаря диэлектрическим свойствам и высокой механической прочности слоя $SiN_x$, разница в площади

мембран не оказывает влияния на результаты электрохимических измерений. Целостность сформированных мембран проверяется с помощью оптического микроскопа Vistec INM 100 в режимах светлого и темного поля, изображение свободноподвешенной $SiN_x$ мембраны представлено на рисунке 19 – а.

Формирование одиночных нанопор в свободно подвешенных $SiN_x$ мембранах производится методом травления сфокусированным электронным пучком в просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ). Электронный пучок (200 кВ, ~ 0,5 нА) фокусируется в пятно диаметром несколько нм и экспонирует мембрану в течении нескольких десятков секунд. Диаметр и время экспозиции пучка зависят от необходимого диаметра нанопоры и толщины мембраны. В экспериментах по управлению ионным транспортом использовались нанопоры диаметром ~ 5 нм (см. рисунок 19 – д.), для их формирования режим работы электронного пучка составил: диаметр пучка 2-3 нм, время удержания ~ 10 сек. ПЭМ изображения нанопор изготовленных при данных условиях представлены на рисунке 19 – б. В экспериментах по детектированию и фиксации одиночных молекул, диаметр пор составлял 8-10 нм, что обусловлено крупными размерами исследуемых белковых молекул.

Для обеспечения оптимальной упаковки нанопоровых образцов на Si пластине, была выбрана архитектура $SiN_x$/Si нанопоровых чипов, представленная на рисунке 19 – в. Нанопоровый чип представляет собой пластину 10*10 мм с четырьмя $SiN_x$ мембранами, расположенными в углах пластины (обведены на вставке рисунка 19 – в.). Таким образом, нанопоровый чип включает в себя четыре нанопоровых образца. В процессе эксперимента, выбранный для работы нанопоровый образец устанавливается в рабочую зону измерительной ячейки, оставшиеся мембраны при этом остаются снаружи ячейки и готовы к следующим экспериментам. Также была разработана геометрия нанопорового чипа с одной свободноподвешенной $SiN_x$ мембраной (см. рисунок 19 – г.), что облегчает сборку экспериментальной измерительной ячейки.

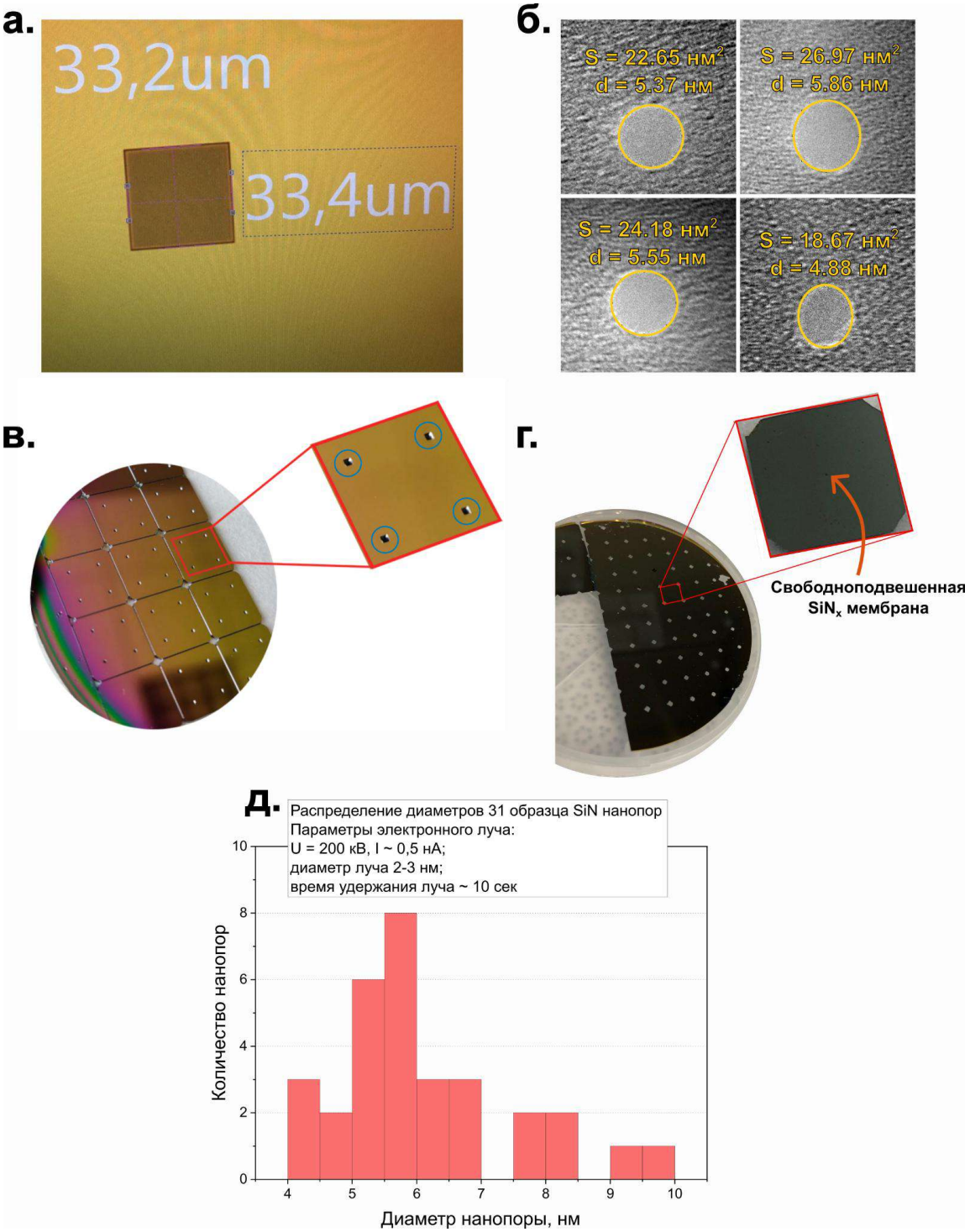


Рисунок 19 – а. Оптическое изображение свободно подвешенной $SiN_x$ мембраны толщиной 40 нм со сторонами 33.2 и 33.4 мкм. б. ПЭМ изображения нескольких сформированных нанопор диаметром ~ 5 нм. в. Изображение тыльной стороны массива чипов изготовленных на одной Si пластине, вставка демонстрирует крупный план тыльной стороны чипа с $SiN_x$ мембранами, сформированными в окнах травления (обведены синим). г. Изображение массива чипов с одной свободноподвешенной $SiN_x$ мембраной. д. Диаграмма распределения диаметров

изготовленных нанопор при целевом диаметре 5 нм и заданных параметрах электронного луча.

## 2.2 Формирование Au плазмонной антенны-бабочки на поверхности $SiN_x$ мембраны

Интеграция $SiN_x$/Si образца и плазмонной структуры, представляющей собой Au антенну-бабочку (bow-tie антенну), происходит после формирования свободно подвешенной $SiN_x$ мембраны как показано на рисунке 20 – а. (этап 1), но до формирования одиночной нанопоры. Для этого на лицевую поверхность мембраны наносится двойной слой фоторезиста полидиметилглутаримид (PMGI)/полиметилметакрилат (PMMA). Формирование слоев производится методом центрифугирования, после чего область будущих антенн-бабочек экспонируется в ходе процесса электронной литографии (25 кВ). После процесса проявления, на пластину последовательно напыляются: слой Cr толщиной ~ 3 нм (для улучшения адгезии следующего слоя); слой Au толщиной ~ 20 нм (этап 4 на рисунке 20 – а.). Следующим этапом, неэкспонированные участки фоторезиста с лежащим на них слоем Cr/Au удаляются методом взрывной фотолитографии (lift-off), оставляя на поверхности мембраны одиночную антенну-бабочку. Каждая антенна-бабочка состоит из двух равнобедренных треугольников длиной ~ 200 нм, направленных вершинными углами друг к другу. Зазор между треугольниками составляет ~ 20 нм (см. рисунок 20 – б.) и именно в этой области происходит наибольшее усиление электромагнитного поля. Характеризация $SiN_x$ мембран и плазмонных антенн-бабочек производится с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Zeiss Supra 25 (см. рисунок 20 – в.).

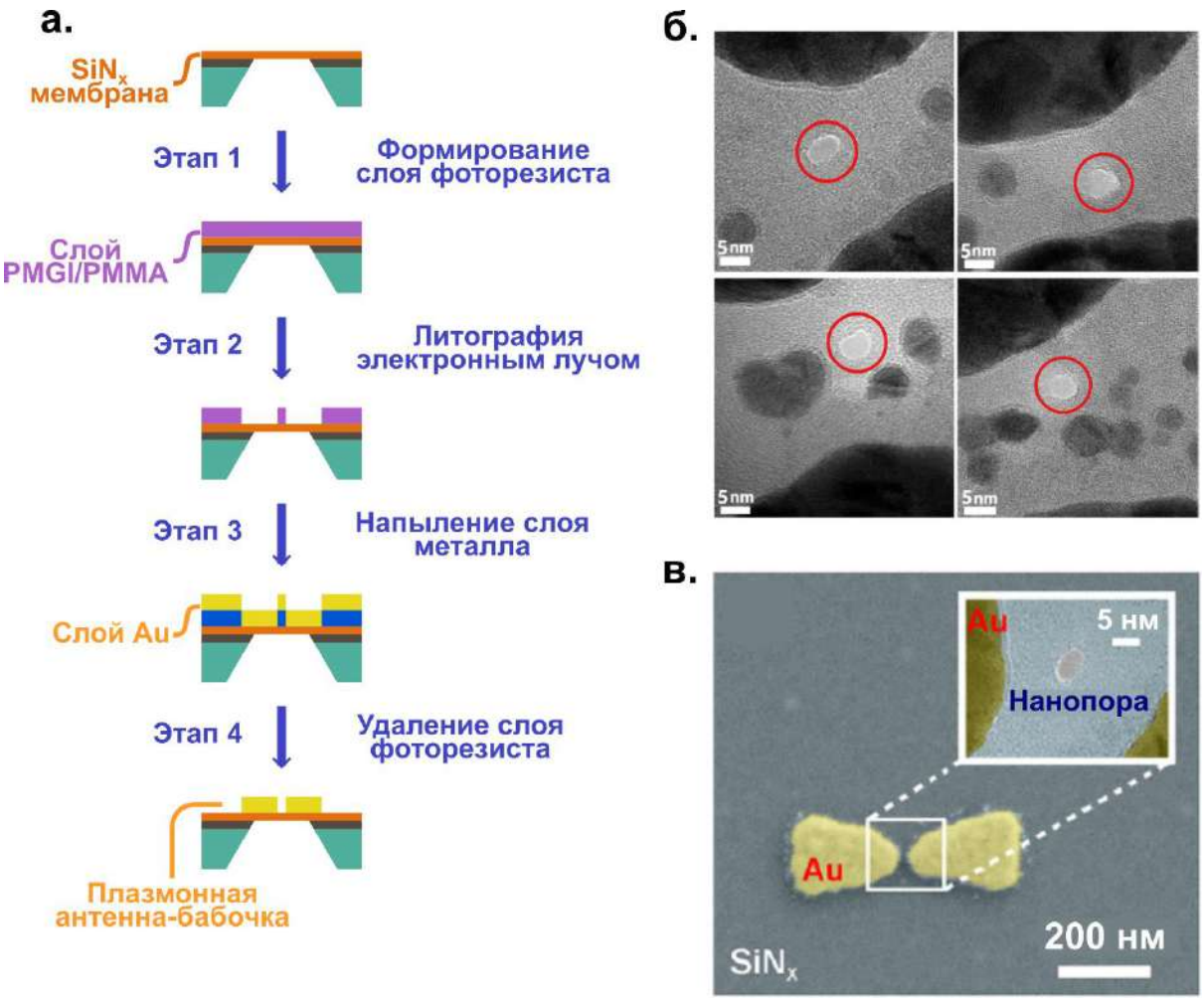


Рисунок 20 – а. Схематическое изображение ключевых этапов формирования плазмонных антенн - бабочек на поверхности свободно подвешенной $SiN_x$ мембраны. б. ПЭМ изображения одиночных нанопор, сформированных в зазоре плазмонных антенн-бабочек (выделены красным). в. СЭМ изображение сформированной антенны бабочки (окрашена желтым), вставка (ПЭМ изображение) демонстрирует место расположения одиночной поры в зазоре антенны.

Далее, в зазоре между вершинных углов плазмонной антенны формируется одиночная нанопора диаметром ~ 5 нм (этап 6 на рисунке 20 – а., вставка на рисунке 20 – в.). Процесс формирования нанопоры полностью идентичен описанному в разделе 2.1. На ПЭМ изображениях одиночных плазмонных пор, представленных на рисунке 20 – б., в зазоре плазмонных антенн наблюдается наличие Au наночастиц, оставшихся после процесса взрывной фотолитографии (темные пятна

вокруг нанопор). Диаметр таких частиц находится в диапазоне 2 - 8 нм, что является недостаточным для изменения локализованной оптической моды. Таким образом, наличие паразитных Au наночастиц в зазоре плазмонной антенны не должно оказывать существенного влияния на характеристики нанопоровой системы.

Исследование оптических резонансных свойств сформированных антенн-бабочек проводилось с использованием метода темнопольной спектроскопии. Линейно поляризованный белый свет от галогенного источника вольфрама (Avantes AvaLight-HAL-S) фокусировался объективом (Mitutoyo MPlanApo 10, числовая апертура (NA) 0,26) на образце при наклонном падении (приблизительно 21° к поверхности образца). Свет, рассеянный наноструктурами поверхности, собирался вторым объективом (Mitutoyo MPlanApo 50, NA = 0,55) и анализировался спектрометром (Horiba LabRAM HR 800 UV-vis-NIR) в конфокальном расположении. Такая конфигурация позволяет возбуждать как внутриплоскостные, так и внеплоскостные дипольные резонансы, поддерживаемые одиночными наночастицами.

## 2.3 Создание измерительных ячеек для электрохимических экспериментов

### Общие принципы конструкции и изготовления измерительных электрохимических ячеек

Для проведения экспериментов с одиночными $SiN_x$ нанопорами, одиночными плазмонными $SiN_x$ нанопорами, а также $Al_2O_3$ и $C/Al_2O_3$ пористыми мембранами, был разработан ряд измерительных электрохимических ячеек, обладающих различным функционалом и характеристиками [106]. Общими требованиями к измерительным электрохимическим ячейкам являются: наличие двух независимых объемов для буферного раствора электролита (cis- и trans-объемы); возможность установки нанопорового образца; возможность установки измерительных электродов в объемы ячейки; наличие систем подвода/отвода жидкости в каждом объеме ячейки; совместимость материала ячеек с водными растворами электролитов и широким спектром биологических молекул;

герметичность готовой к работе измерительной системы. Для удовлетворения этих требований, архитектура будущих измерительных ячеек была разработана в САПР AutoCAD (Autodesk), что позволило работать с 3D-моделью ячейки и оперативно вносить необходимые изменения в ее конструкцию. На основе созданной 3D-модели, ячейки изготавливалась методом фотополимерной 3D-печати на принтерах Form 2 (полимер Clear V4) и Form 3b+ (полимер Surgical Guide V1) компании Formlabs. Стоит отметить, что в работах по управлению ионным транспортом в одиночных $SiN_x$ порах с помощью оптического излучения применялся только принтер Form 2, в других работах применялись оба принтера. Данное условие объясняется отличающимися спектрами поглощения двух используемых марок фотополимера, что могло привести к нежелательным искажениям результатов оптических экспериментов. Никаких других различий в физико-химических характеристиках между изготовленными на разных принтерах ячейками не было обнаружено, поэтому в дальнейшем модель принтера и марка фотополимера не будут уточняться.

Процесс фотополимерной 3D-печати состоит из нескольких стадий:

1. Послойная засветка фотополимера лазерным лучом с его последующим отверждением (полимеризацией) в готовую деталь;
2. Снятие изготовленной детали с печатного стола, удаление остатков неотвержденного полимера и поддерживающих напечатанную деталь вспомогательных конструкций, промывка детали в изопропиловом спирте;
3. Закрепление изготовленной детали под воздействием ультрафиолетового излучения и высокой температуры (60 ˚C), финальная очистка детали в изопропаноле и деионизованной воде.

Использование технологий 3D-печати, позволяет быстро проводить этап прототипирования ячеек (см. рисунок 21 – б.), легко внедрять изменения в их конструкцию, а также обходится без трудоемких методов литья и фрезеровки, необходимых для изготовления деталей сложной геометрии из других материалов.

Все используемые в экспериментах модели ячеек объединяет общая конструкция и принцип работы. Измерительная электрохимическая ячейка состоит

из независимых cis- и trans- объемов (половинок ячейки), заполняемых буферным раствором электролита в процессе подготовки к эксперименту (рисунок 21 – а.). Нанопоровый образец устанавливается между cis- и trans- объемами ячейки таким образом, чтобы внутренний объем поры соединял эти независимые объемы. Установка нанопорового чипа происходит с помощью прокладок (внешний диаметр 6 мм, внутренний диаметр 3 мм) из полидиметилсилоксана (ПДМС), обеспечивающих герметичное соединение образца и объемов ячейки. Фиксация объемов ячейки относительно друг друга и надежная фиксация нанопорового образца между ними реализуется с помощью четырех винтовых соединений. Cis- и trans- объемы содержат отверстия для установки измерительных Ag/AgCl электродов. Герметичная установка и фиксация положения электродов во время эксперимента также обеспечивается с помощью ПДМС прокладок с внешним диаметром 6 мм и внутренним диаметром 1 мм. Кроме измерительных электродов, к каждому объему измерительной ячейки подведены капилляры для подвода и отвода жидкости (см. рисунок 21 – в.). Капилляры представляют собой гибкие капиллярные трубки из поливинилхлорида (ПВХ) с внутренним диаметром 1 мм. Прочная и герметичная установка капилляров обеспечивается через разъемы конусообразной формы, что позволяет обойтись без использования дополнительных прокладок. Система подвода и отвода жидкости необходима для удобного заполнения ячейки раствором, возможности замены растворов между измерениями, а также для обеспечения герметичности системы. Минимизация контакта используемых растворов с внешней средой, важна для поддержания чистоты эксперимента.

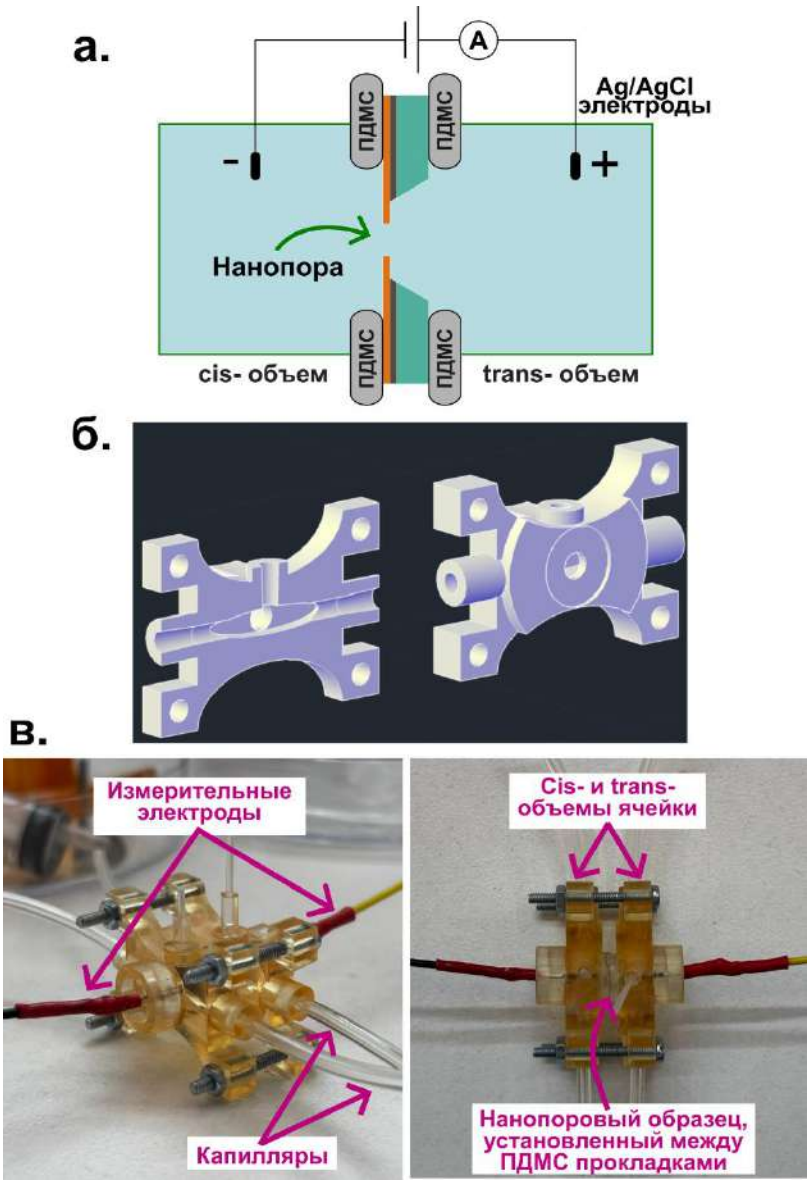


Рисунок 21 – а. Схематическое изображение измерительной ячейки с установленным в нее нанопоровым образцом. б. 3D модель объема измерительной ячейки в разрезе (справа) и целиком (слева). в. Изображение готовой к эксперименту ячейки с обозначенными основными составляющими измерительной системы.

**Электрохимические ячейки для исследования ионного транспорта в одиночных нанопорах и пористых $Al_2O_3$, $C/Al_2O$ мембранах**

Электрохимические ячейки, предназначенные для исследования ионного транспорта в одиночных $SiN_x$ нанопорах и пористых $Al_2O_3$ и $C/Al_2O_3$ мембранах, представляют собой одинаковые по своим параметрам cis- и trans- объемы ~ 650

мкл каждый [106]. Данный тип электрохимических ячеек позволяет устанавливать измерительные электроды близко к исследуемому образцу, увеличивая проводимость нанопоровой системы. За время работ по исследованию ионного транспорта, было изготовлено несколько версий данного типа ячеек, отличающихся расположением отверстий для установки электродов и капилляров. В остальном характеристики ячеек не претерпевали значительных изменений. 3D модель одного из объемов ячейки представлена на рисунке 22 – а.

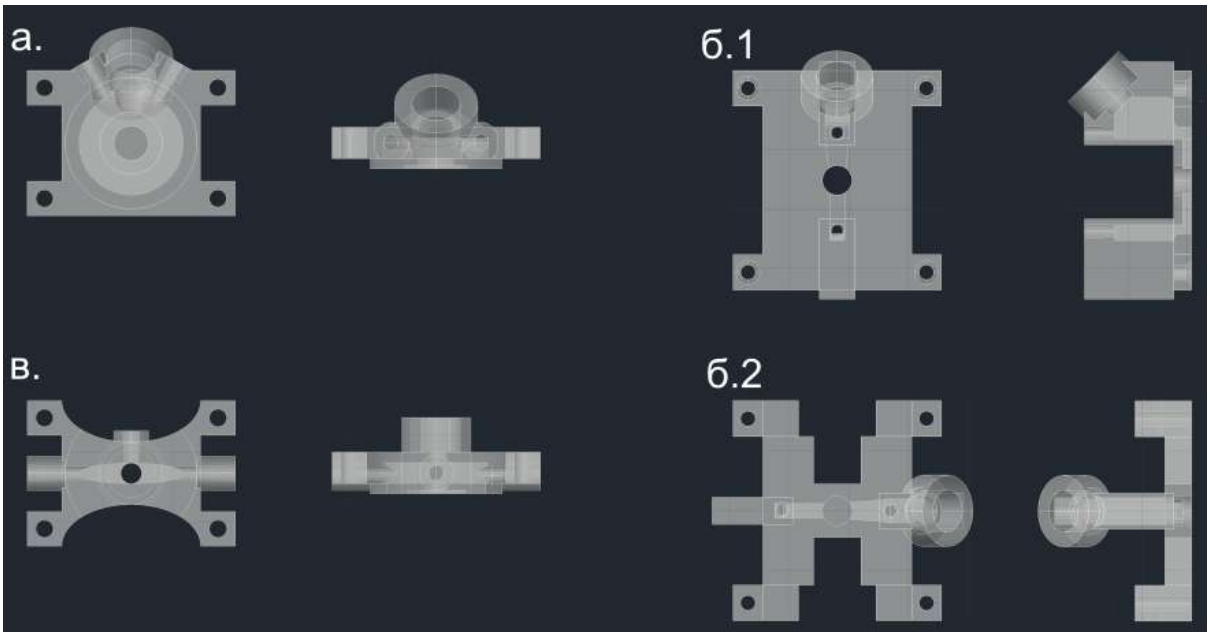


Рисунок 22 – а. 3D модель cis- и trans- объемов измерительной ячейки для измерения ионного тока в одиночных нанопорах и пористых $Al_2O_3$, $C/Al_2O$ мембранах. б.1-2. 3D модель cis- и trans- объемов измерительной ячейки для проведения оптических измерений. в. 3D модель cis- и trans- объемов измерительной ячейки для проведения измерений с биологическими молекулами.

**Электрохимические ячейки для оптических измерений**

Для обеспечения возможности комбинирования электрических и оптических методов воздействия на ионный транспорт в одиночных $SiN_x$ нанопорах и одиночных плазмонных $SiN_x$ нанопорах, в конструкцию электрохимических измерительных ячеек был внесен ряд измерений. Cis- и trans- объемы ячейки стали располагаться в вертикальной плоскость как показано на рисунке 22 – б.1-2. Также в cis- объеме полностью удалена нижняя плоскость, на место которой

устанавливается покровное стекло, формирующее дно внутреннего канала. Стекло, герметично вклеиваемое в ячейку при помощи двухкомпонентной эпоксидной смолы, обеспечивает оптический доступ (оптическое окно) к $SiN_x$ мембране и одиночной нанопоре. Комбинация измерительной ячейки и оптического микроскопа, позволяет использовать объективы с фокусным расстоянием >5 мм, для реализации методов оптического воздействия на транспортные характеристики одиночных нанопор и одиночных плазмонных нанопор. Кроме того, оптическое окно позволяет проводить картирование свободно подвешенных $SiN_x$ мембран методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР спектроскопии), в том числе обнаруживать одиночные объекты, например частицы кремния d ~ 200 нм. Внесенные в конструкцию ячейки изменения привели к небольшим различиям в геометрии cis- и trans- объемов, вмещающих по ~ 550 и ~ 650 мкл буферного раствора соответственно.

**Электрохимические ячейки для проведения экспериментов с биологическими молекулами**

Первоначальные эксперименты по детектированию одиночных биообъектов на примере молекул ДНК были проведены с помощью ячеек для исследования ионного транспорта. Однако, в результате экспериментов был выявлен ряд недостатков, заключающихся в слишком большой вместительности cis- и trans- объемов, приводящей к повышенному расходу исследуемого вещества, а также в отсутствии удобной возможности добавления в ячейку малых объемов веществ (0.1-10 мкл) непосредственно во время эксперимента. Добавление в cis- объем ячейки исследуемых веществ, проводилось с помощью одноразового шприца через капилляры подвода раствора или с помощью иглы через ПДМС прокладку электрода. В последнем случае игла прокалывала прокладку насквозь и раствор вводился непосредственно в объем ячейки. Оба описанных способа требовали предварительного разбавления исследуемого вещества в буфере, поскольку шприцы вместимостью 1 - 1.5 мл неэффективны при работе с малыми объемами жидкости (<100 мкл). Кроме того, контакт рабочего раствора с металлической

иглой шприца может приводить дополнительному загрязнению системы. Для устранения перечисленных недостатков был создан новый тип ячеек, специально предназначенный для работы с малыми концентрациями биологических соединений (см. рисунок 22 – в.). Cis- и trans- объемы были уменьшены до ~ 100 мкл. Для быстрого и удобного добавления в ячейку исследуемых веществ в объемах 0.1 - 10 мкл, в cis- и trans- объемах были сформированы дополнительные отверстия. При заполнении ячейки и во время проведения предварительных экспериментов, данные отверстия герметично закрыты ПВХ заглушками. При необходимости добавления исследуемого вещества, заглушки убираются и необходимый объем вещества добавляется в ячейку при помощи дозатора без использования шприца. После добавления вещества заглушка возвращается на место для предотвращения попадания в систему загрязнений.

## 2.4 Подготовка образцов и методика проведения электрохимических измерений

**Протокол подготовки к эксперименту образцов одиночных нанопор и измерительной ячейки**

Для исследования транспорта ионов и биологических молекул через единичную нанопору была разработана последовательность операций, позволяющая эффективно заполнить систему рабочим раствором и смочить нанопору. При подготовке к экскременту производились следующие действия:

1. Перед проведением экспериментов нанопоровый чип характеризуется с помощью оптического микроскопа в режимах светлого и темного поля, для проверки целостности $SiN_x$ мембраны и отсутствия крупных загрязнений на ее поверхности;
2. Для придания гидрофильных свойств $SiN_x$ мембране и удаления возможных органический загрязнений с ее поверхности, нанопоровый образец обрабатывается в растворе пираньи ($H_2SO_4$ + $H_2O_2$ (объемные доли 3:1) в течении 60 минут;
3. После обработки в растворе пираньи, нанопоровый чип ополаскивается большим количеством деионизованной воды, с удельным сопротивлением R ~ 18 Мом*см, для удаления остатков кислоты. Далее, чип помещается в емкость с

деионизованной водой и содержится в ней до момента установки в измерительную ячейку;

4. Cis- и trans- объемы измерительной ячейки последовательно ополаскиваются изопропиловым спиртом (изопропанолом) и большим количеством деионизованной воды. После промывки, ячейка высушивается потоком сжатого воздуха;
5. Капилляры подвода/отвода жидкости последовательно промываются изопропанолом и деионизованной водой, после чего продуваются сжатым воздухом для удаления остатков жидкости. Чистые капилляры монтируются в соответствующие отверстия измерительной ячейки;
6. Поверхность ПДМС прокладок для установки нанопорового чипа и измерительных электродов очищается от пыли с помощью скотча (клеящее вещество - синтетический акрил). Далее, прокладки обрабатываются в изопропаноле в течении 10 минут для лучшей очистки и придания их поверхности гидрофильных свойств. После обработки, прокладки промываются большим количеством деионизованной воды, высушиваются потоком сжатого воздуха и устанавливаются в измерительную ячейку;
7. Измерительные Ag/AgCl электроды хлорируются (обновляются) перед каждым экспериментом для обеспечения стабильных электрохимических измерений. Реакция анодного осаждения хлорида серебра ($Ag + Cl^- \leftrightarrow AgCl + e^-$) проводится в водном растворе KCl при концентрации 1M, в качестве второго электрода используется Pt пластина. Обновленные электроды промываются изопропанолом и деионизованной водой, после чего устанавливаются в ячейку через ПДМС прокладки;
8. Нанопоровый образец вынимается из емкости с водой, дополнительно промывается большим количеством деионизованной воды и обдувается потоком сжатого воздуха для удаления жидкости из области мембраны. Поток воздуха необходимо направлять под острым углом к поверхности для предотвращения повреждения мембран избыточным давлением;

9. ПДМС прокладки устанавливаются на поверхность нанопорового образца с лицевой и тыльной стороны таким образом, чтобы предназначенная к использованию $SiN_x$ мембрана с одиночной порой оказалась во внутреннем диаметре прокладок;
10. Нанопоровый образец с ПДМС прокладками совмещается с cis- и trans- объемами измерительной ячейки для образования сквозного канала между ними через внутренний объем нанопоры. Далее, объемы ячейки фиксируются друг относительно друга с помощью винтовых соединений. После фиксации, измерительная ячейка (система) готова к заполнению рабочими растворами и проведению измерений.

**Подготовка к эксперименту образцов $Al_2O_3$ и $C/Al_2O_3$ пористых мембран**

Перед установкой в измерительную ячейку, образец пористой мембраны ($Al_2O_3$ или $C/Al_2O_3$) необходимо последовательно промыть изопропанолом и большим количеством деионизированной воды для удаления возможных загрязнений. После промывки образцы продуваются сжатым воздухом для удаления остатков жидкости. Поток воздуха необходимо направлять под острым углом к поверхности для предотвращения повреждения пористой мембраны избыточным давлением. В остальном, протокол подготовки измерительной ячейки, включая электроды, капилляры и прокладки идентичен протоколу для $SiN_x$ нанопор.

**Протокол подготовки буферных растворов и заполнения измерительной ячейки**

1. Все используемые в работе буферные растворы хранятся в закрытых пробирках при температуре ниже 0 ˚C для уменьшения количества пузырей газа в объеме раствора и защиты от внешних загрязнений;
2. Перед экспериментом необходимые растворы размораживаются, фильтруются через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и проходят процедуру дегазации в эксикаторе (без использования вакуумной смазки);

3. Для первоначального заполнения объемов измерительной ячейки используется раствор изопропанола и деионизованной воды (1:1), необходимый для эффективного смачивания внутренних поверхностей ячейки, прокладок и нанопорового образца. Смачивание внутренних поверхностей имеет критическое значение для минимизации образования газовых пузырей в процессе электрохимических измерений. Заполнения ячейки происходит путем формирования в системе пониженного давления с помощью шприца большого объема (50 мл), подключенному к капилляру отвода жидкости. Раствор поступает в объем ячейки через капилляр ввода жидкости, погруженного в пробирку с раствором;
4. После заполнения раствором изопропанола и деионизованной воды, ячейка дегазируется в эксикаторе в течении 15 минут, после чего внутренний объем ячейки визуально проверяется на наличие пузырей газа, которые могут образовываться на стенках измерительной системы, поверхности нанопорового образца или ПДМС прокладок. При обнаружении, пузыри удаляются из системы через систему капилляров;
5. На следующем этапе объемы ячейки промываются большим количеством деионизованной воды (~ 20 мл на каждый объем) для удаления изопропанола из измерительной системы. Замена жидкости происходит путем ввода нового раствора через шприц, соединение шприца с капилляров ввода жидкости производится методом “капля к капле” для предотвращения попадания пузырей газа в ячейку;
6. После промывки происходит замена деионизованной воды на рабочий раствор электролита (процесс аналогичен прошлому пункту). По завершению процесса, измерительная ячейка с одиночной нанопорой готова к проведению электрохимических измерений.

   Протокол заполнения измерительной ячейки с установленной в ней $Al_2O_3$ или $C/Al_2O_3$ пористой мембраной полностью идентичен протоколу для одиночной $SiN_x$ нанопоры.

**Методика проверки работоспособности одиночных нанопор и пористых мембран с помощью предварительных электрохимических измерений**

Проведение измерений ионного тока, протекающего через одиночную нанопору, становится возможным после заполнения электрохимической ячейки буферным раствором электролита. Все измерения на данном этапе проводятся с помощью источника - измерителя напряжения и тока Keithley 2636B (Tektronix), позволяющему с высокой точностью измерять ионные токи с точностью до 0.1 пА, а также прикладывать к системе широкий диапазон напряжений. Обычно, используемые при работе с нанопоровыми образцами напряжения лежат в диапазоне ±10 мВ. Первоочередной задачей при проведении электрохимических измерений является проверка успешного заполнения поры раствором электролита, а также отсутствия в поре загрязнений, которые могут оказывать влияние на ионный и молекулярный транспорт. Для этого, на измерительные электроды подается фиксированная разность потенциалов (обычно 300 мВ) и измеряется протекающий через нанопору ток. Измеренное среднее значение ионного тока $I_{средн}$ сравнивается с теоретическим значением тока $I_{теор}$ для поры с диаметром, полученным в результате характеризации образца в ПЭМ, согласно формуле (1).

Случай, когда экспериментальное значение ионного тока меньше теоретического в 2 и более раза, может сигнализировать о наличии газового пузыря или загрязнения в области одиночной нанопоры. В обоих случаях часть объема поры не заполнена электролитом, что снижает проводимость структуры и требует проведения дополнительной серии измерений с последовательным прикладыванием к исследуемой системе высоких напряжений (до ±10 В). Эти действия направлены на удаление газового пузыря или молекул загрязнителя из области поры за счет создания в ней высокой напряженности электрического поля. Удаление из области нанопоры загрязнений/газового пузыря сопровождается резким увеличением уровня ионного тока до значений близких к теоретическим и позволяет перейти к проверке стабильности ионного транспорта нанопоровой структуры. В случае невозможности очищения поры при помощи прикладываемого напряжения, измерительная ячейка дегазируется в эксикаторе в

течении 10 минут после чего цикл электрохимических измерений повторяется. Если эти действия не приносят результата, то ячейку необходимо разобрать, провести процедуру очистки мембраны в растворе пиранья, после чего повторить измерения. Ситуация $I_{средн} > I_{теор}$ означает увеличившийся размер измеряемой нанопоры. В таком случае необходимо рассчитать эффективный диаметр поры и оценить возможность ее применения в данном эксперименте.

На следующем этапе нанопоровый образец, демонстрирующий удовлетворительный уровень ионного тока, проходит проверку стабильности своих транспортных характеристик. Для этого производится цикл длительных (не менее 30 минут) измерений ионного тока при фиксированном напряжении, обычно используемым в нанопоровых экспериментах (±100 мВ или ± 300 мВ). Удовлетворительным является уровень ионного тока $I_0$ лежащий в диапазоне ± 10% от среднего $I_{средн}$ на всем протяжении измерения (исключая первые 1-2 минуты, в течении которых существенно влияние переходных процессов), как показано на рисунке 23. Одиночная нанопора, демонстрирующая стабильный уровень тока, пригодна к проведению последующих экспериментов.

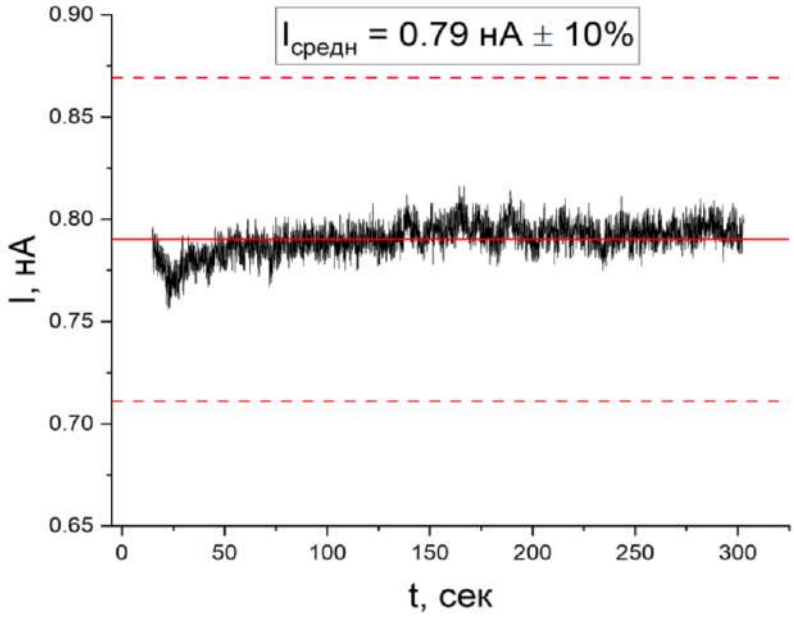


Рисунок 23 – Пример зависимости уровня нанопорового ионного тока от времени, лежащего в диапазоне ± 10% от $I_{средн}$.

Проверка пригодности к экспериментам пористых мембран $Al_2O_3$ и $C/Al_2O_3$ носит более условный характер - для признания пригодной к дальнейшим экспериментам, теоретическое $I_{теор}$ и экспериментальное среднее $I_{средн}$ значение ионного тока пористой мембраны не должны различаться более чем в 10 раз. Такой подход обусловлен сложностью достоверной характеризации всей поверхности пористой мембраны, а также массива внутренних каналов, для точного теоретического расчета величины ионного тока. Ситуация $I_{средн} >> I_{теор}$ свидетельствует о наличии структурных повреждений пористой мембраны (трещины, сколы, ростовые дефекты и.т.д.) и невозможности ее дальнейшего использования в эксперименте. Ситуация $I_{средн} << I_{теор}$ указывает на наличие газового пузыря на поверхности мембраны или загрязнений/структурных дефектов в массиве пор. Газовый пузырь может быть удален с помощью дегазации измерительной ячейки, после чего мембрана будет пригодна к экспериментам. В то же время, наличие загрязнений в пористой мембране означает ее непригодность к проведению экспериментов, поскольку очистка пористых мембран является сложным процессом и не отрабатывалась в рамках комплекса представленных здесь работ.

**Методика проведения потенциостатических измерений ионного тока в одиночных нанопорах и пористых мембранах**

Измерение ионного тока в потенциостатическом режиме, т.е. измерение тока при фиксированной разности потенциалов является основным методом работы как с одиночными нанопорами так и с пористыми мембранами. Исследования характеристик нанопор, а также работы по детектированию и анализу одиночных молекул в данной работе, основываются на проведении потенциостатических измерений.

Потенциостатические измерения, направленные на изучение механизмов ионного транспорта в одиночных нанопорах и пористых мембранах, проводились с помощью источника-измерителя тока и напряжения Keithley 2636B (Tektronix). Относительно низкая частота регистрации тока ~ 10 Гц достаточна для

исследования ионного транспорта в данном режиме. Электрохимические измерения проводятся в клетке Фарадея, представляющей собой металлическую коробку, соединяющий Ag/AgCl электроды электрохимической ячейки с наружными триаксиальными кабелями источника-измерителя. Клетка необходима для экранирования внешних электромагнитных полей и минимизации влияния электрических шумов на результаты измерений. Схемы экспериментальных установок представлены на рисунке 24 – а,б. Если эксперимент подразумевает использование различных концентрациях электролита, измерения проводятся в строгой последовательности от наименьшей концентрации буферного раствора к наибольшей. Соблюдение этого условия чрезвычайно важно для получения достоверных экспериментальных результатов, поскольку разница между концентрациями растворов электролита в рамках одного эксперимента может достигать 4-5 порядков величины. Для экспериментов с одиночными нанопорами и пористыми мембранами, обычным является использование водных растворов KCl с концентрациями 0.1мМ - 1М и 0.01мМ - 1М соответственно.

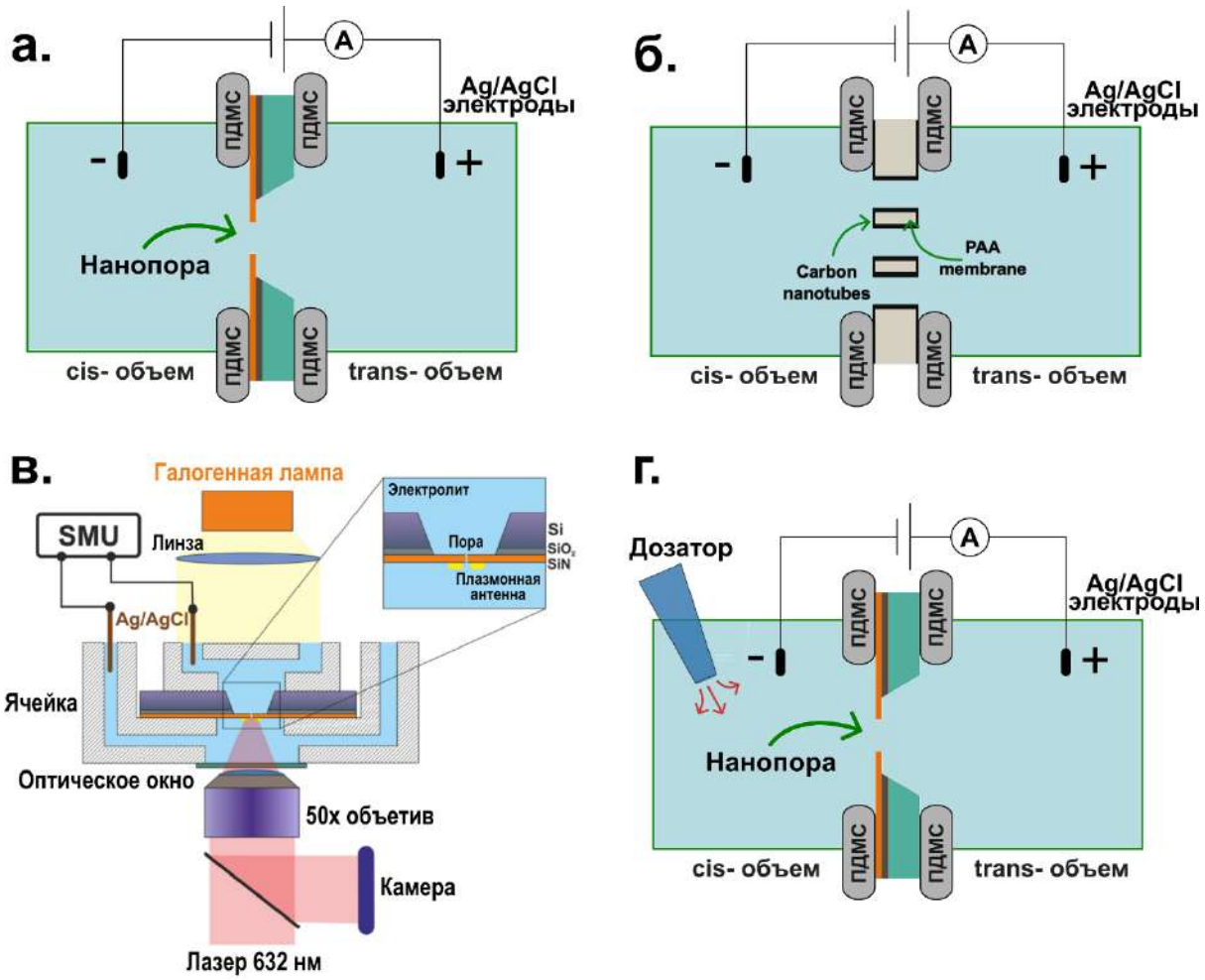


Рисунок 24 – а. Схема проведения эксперимента по изучению ионного транспорта в одиночной $SiN_x$ нанопоре. б. Схема проведения эксперимента по изучению ионного транспорта в $C/Al_2O_3$ пористой мембране. в. Схема проведения эксперимента по управлению ионным транспортом в одиночной $SiN_x$ нанопоре с помощью оптического излучения. г. Схема проведения эксперимента по детектированию одиночных молекул (на примере молекул 20S протеасом) с помощью одиночной $SiN_x$ нанопоры.

**Методика проведения оптических экспериментов с одиночными $SiN_x$ нанопорами**

Исследования влияния излучения на транспортные характеристики одиночных $SiN_x$ нанопор проводятся с использованием оптического микроскопа Horiba LabRAM HR800 UV-vis-NIR. Для этого в нижней плоскости клетки Фарадея формируется отверстие (оптическое окно диаметром 10 мм). При этом клетка

частично теряет свои экранирующие свойства, но сохраняет свои габариты, удобные для установки на предметный столик микроскопа. Измерительная электрохимическая ячейка с оптическим доступом (см. рисунок 24 – в.) монтируется в клетку Фарадея таким образом, чтобы оптическое окно ячейки совпадало с оптическим окном клетки. Таким образом реализуется возможность оптического наблюдения за областью свободно подвешенной мембраны с помощью объективов микроскопа.

Расстояние от нижней плоскости клетки Фарадея до плоскости мембраны составляет ~ 4 мм, таким образом, в оптических измерениях возможно применение объективов с фокусным расстоянием ≥ 5 мм. Грубое совмещение оптической оси микроскопа с областью мембраны проводится с помощью 10х объектива, тонкая фокусировка и воздействие на пору концентрированным лазерным излучением осуществляется с помощью 50х объектива (Olympus LMPlanFL 50x). В качестве источников лазерного излучения использовались: лазерный диод $\lambda$ = 632 нм; зеленый лазер $\lambda$ = 534 нм. Место фокусировки лазерного луча на мембране контролировалось в реальном времени через матрицу прибора с зарядовой связью (ПЗС матрицу). Система прецизионной фокусировки позволяет сфокусировать лазерное излучение в область диаметром ~10 мкм, достигая плотности оптической мощности $P_{опт}$ ~ 10 КВт/см$^2$ для лазерного диода $\lambda$ = 632 нм.

Воздействие на нанопору излучением в широком спектральном диапазоне осуществляется с помощью встроенной в микроскоп галогенной лампы. Данная методика не нуждается в фокусировке излучения, которое вводится в область мембраны через стенки верхней полусфера измерительной ячейки (не через оптическое окно). Галогенная лампа обладает широким спектром излучения, перекрывающим видимый диапазон (400-1000 нм), что при освещении всего нанопорового образца (и ячейки целиком) обеспечивает спектральную плотность мощности порядка $P_{опт}$ ~ 35 мВт/см$^2$.

Методика оптических экспериментов заключается в проведении длительных по времени потенциостатических измерений ионного тока через нанопору, во

время которых образец облучается сфокусированным лазерным или рассеянным широкополосным излучением.

**Методики исследования температурной динамики $SiN_x$ мембран**

Зависимость температуры нанопоровой системы от воздействия оптического излучения была исследована двумя методами. В первом температура буферного раствора измерялась с помощью термоэлектрического преобразователя (термопары). Термопара устанавливалась вместо Ag/AgCl электрода в cis-объем измерительной ячейки с оптическим доступом (см. рисунок 25) таким образом, чтобы чувствительный элемент находился в буферном растворе. После установки, термопара подключалась к цифровому мультиметру, что позволяло регистрировать температурную динамику буферного раствора в реальном времени. Исследования температурной динамики буферного раствора были проведены для случаев: отсутствия излучения; сфокусированного лазерного излучения ($P_{опт}$ ~ 10 КВт/см$^2$, $\lambda$ = 632 нм); широкополосного излучения галогенной лампы ($P_{опт}$ ~ 35 мВт/см$^2$, $\lambda$ = 400-1000 нм). Стоит отметить, что из-за установки термопары в разъем Ag/AgCl электрода, проведение электрохимических измерений одновременно с температурными невозможно.

Вторым методом является косвенное исследование температуры поверхности $SiN_x$ мембраны, заключающееся в измерении сдвига спектра комбинационного рассеяния одиночной Si наночастицы [92], локализованной на поверхности мембраны. Сдвиг КР спектра частицы может возникать вследствие ее нагрева при воздействии оптического излучения. Для этого на свободно подвешенную $SiN_x$ мембрану (без нанопоры) осаждаются полученные с помощью лазерной абляции Si наночастицы диаметром ~ 200 нм. Мембрана с наночастицами устанавливается в измерительную ячейку с оптическим доступом заполненную деионизованной водой. Различия в коэффициентах поглощения деионизованной воды и водных растворов KCl (используемых в электрохимических измерениях) считаем малыми и не оказывающими существенного влияния на эксперимент. Далее, на КР спектрометре Horiba LabRam HR с возбуждающим лазером $\lambda$ = 534

нм, проводилось картирование области $SiN_x$ мембраны до момента обнаружения спектра одиночной Si наночастицы (пик интенсивности соответствует волновому числу k ~ 520 $см^{-1}$). Измерение КР спектра одиночной Si наночастицы проводилось до облучения мембраны излучением, а также после облучения области частицы сфокусированным лазерным излучением ($P_{опт}$ ~ 10 $КВт/см^2$, λ = 632 нм.) и широкополосным излучением галогенной лампы ($P_{опт}$ ~ 35 $мВт/см^2$) в течении 3 мин. После чего спектры Si наночастицы до и после оптического воздействия сравнивались между собой.

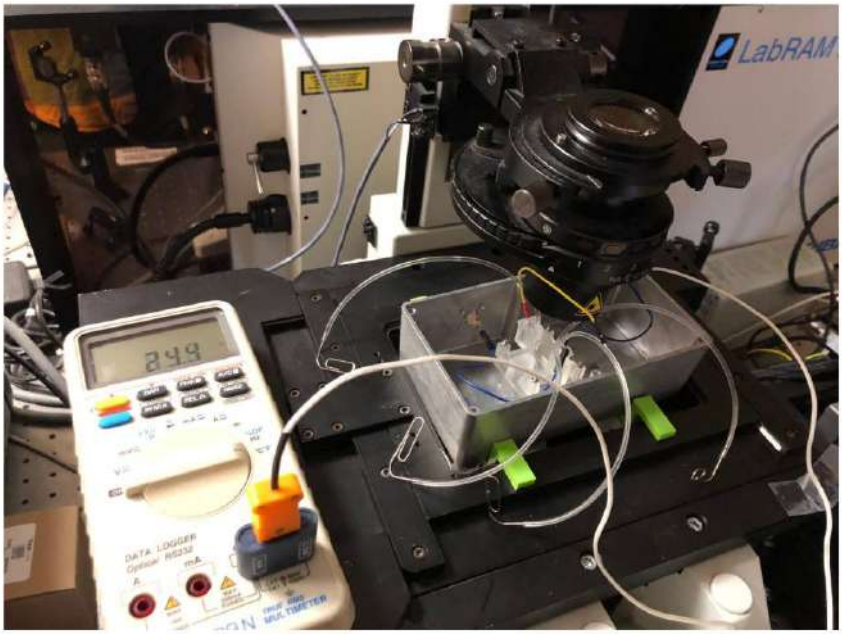


Рисунок 25 – Измерительная ячейка, с термопарой установленной в cis- объеме через отверстие для измерительного Ag/AgCl электрода. Измерения температуры производятся при помощи цифрового мультиметра, подключенного к термопаре.

**Методика проведения экспериментов по детектированию и фиксации молекул в одиночных нанопорах**

Методика экспериментов с биологическими объектами (белковыми молекулами) заключается в проведении серии электрохимических измерений, направленных на регистрацию ионного тока через нанопору до и после добавления в буферный раствор электролита, содержащего исследуемые молекулы. Первый этап экспериментов заключается в исследовании стабильности используемого нанопорового образца, заключающегося в проводедении длительных по времени

(> 30 мин) потенциостатических измерений, в ходе которых удовлетворительным является величина ионного тока $I_0$, лежащая в диапазоне ± 10% от $I_{средн}$. В таком случае нанопоровый образец считается стабильным, используемый буферный раствор достаточно чистым, а измерительная система (нанопоровый биосенсор) готова к экспериментам по детектированию и фиксации одиночных биологических молекул. Следующим этапом в cis- объем измерительной ячейки добавляются молекулы исследуемого вещества. В первоначальной геометрии измерительных ячеек, добавление исследуемых молекул осуществлялось через капилляр подвода жидкости или сквозь ПДМС прокладку Ag/AgCl электрода с помощью шприца. При оптимизированной под биологические эксперименты геометрии ячеек, добавление молекул осуществляется с помощью дозатора через специальное отверстие. Использование дозатора позволяет увеличить концентрацию исследуемых молекул в объеме ячейки (нет необходимости предварительного разбавления аналита) а также облегчить и ускорить процесс добавления молекул. Схема экспериментальной установки представлена на рисунке 24 – г.

После добавления исследуемых молекул, цикл потенциостатических измерений повторяется при тех же условиях, что и до добавления молекул. Основным принципом детектирования одиночных молекул является поиск сигналов фиксации молекул на полученных в ходе экспериментов зависимостях ионного тока от времени. После чего осуществляется сравнение обнаруженных сигналов, соответствующих случаям до и после добавления исследуемых молекул в измерительную ячейку. В случае фиксации одиночных белковых молекул в области нанопоры, интерес представляют длительные, “ступенчатые” изменения уровня тока, соответствующие процессу блокировки поры белковой молекулой.

Анализ результатов экспериментов по фиксации одиночных молекул не требует обработки и фильтрации токовой кривой, поскольку процесс фиксации характеризуется большим по продолжительности и амплитуде ступенчатым изменением ионного тока. Критерием события фиксации является отношение его среднего уровня тока I к среднему уровню тока открытой поры $I_0$, удовлетворяющее условию $\frac{I}{I0} < 0.75$. Дальнейший анализ влияния

зафиксированной молекулы на ионной ток поры, заключается в сравнении амплитуд и продолжительностей уровней тока внутри сигнала фиксации.

# 3. Исследование ионного и молекулярного транспорта в нанопорах

## 3.1. Исследование ионной проводимости одиночных $SiN_x$ нанопор при различных концентрациях электролита

Первым этапом работ по изучению характеристик ионного транспорта в одиночных наноразмерных $SiN_x$ порах стало исследование зависимости проводимости нанопор от концентрации буферного раствора электролита. В качестве рабочего электролита был выбран водный раствор KCl благодаря наличию в его составе хлора, необходимого для электрохимических реакций на поверхности измерительных Ag/AgCl электродов, а также доступности и совместимости с биологическими молекулами. KCl будет использоваться и в последующих работах по детектированию молекул ДНК и фиксации белков. В данных измерениях использовался раствор KCl с изопропиловым спиртом (1:1). В качестве нанопорового образцов использовались $SiN_x$ нанопоры диаметром d ~ 5 нм, и длиной l = 40 нм (без интегрированных плазмонных структур). Геометрия используемых в работе измерительных ячеек соответствовала описанному в разделе 2.1. Подготовка компонентов измерительной системы, а также заполнение измерительной электрохимической ячейки подробно описаны в соответствующих протоколах и методах разделов 2.3, 2.4. После подготовки нанопоровых образцов, были проведены серии потенциостатических измерений для 5 различных концентраций KCl от 0.1 мМ до 1М. Диапазон прикладываемых напряжений составил от -300 мВ до +300 мВ с шагом 100 мВ (исключая измерение при 0 напряжении), продолжительность каждого потенциостатического измерения составляла 8 минут. Таким образом, для каждой концентрации электролита было получено семейство из 6 потенциостатических кривых (см. рисунок 26 – а.). По измеренным потенциостатическим кривым были рассчитаны средние значения ионного тока $I_{средн}$. Начальный период времени потенциостатического измерения характеризуется существенным влиянием переходных процессов измерительной системы, включая изменение конфигурации ДЭС, вследствие чего первые секунды измерения не учитывались при расчете $I_{средн}$ и не приводятся на графиках.

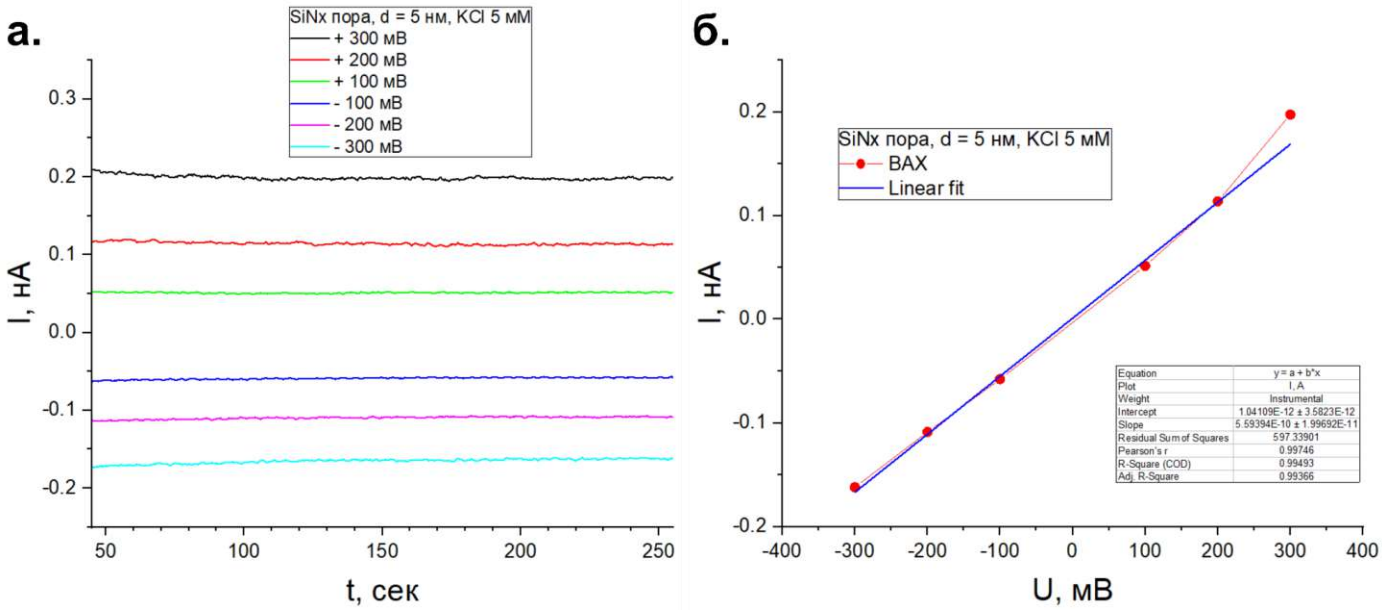


Рисунок 26 – а. Зависимости нанопорового ионного тока от времени, при различных прикладываемых напряжениях, полученных в результате проведения серии потенциостатических измерений. б. ВАХ одиночной $SiN_x$ нанопоры построенной по $I_{средн}$ потенциостатических измерений для концентрации KCl 5 мМ.

По полученным значениям $I_{средн}$ были построены ВАХ и рассчитаны значения проводимости одиночных пор для всего диапазона исследуемых концентраций электролита. Как продемонстрировано на рисунке 26 – б., ВАХ одиночных $SiN_x$ нанопор демонстрируют линейную зависимость на всем диапазоне исследованных концентраций, отсутствие эффекта ИВТ косвенно указывает на цилиндрическую форму канала поры, а также на равномерное распределение заряда на ее стенках и отсутствие загрязнений. В случае, если ВАХ нанопоры не являлась линейной, образец подвергался дополнительной промывке и очистке, после чего измерений начинались с начала.

На рисунке 27 – а. (красные точки) представлена характерная зависимость удельной проводимости (полученная на основе ВАХ нанопорового образца при различных концентрациях электролита) одиночной $SiN_x$ нанопоры от концентрации электролита KCl, демонстрирующая наличие плато проводимости σ ~ 0.1 См/м в диапазоне концентраций 0.05 мМ – 0.5 мМ. При повышении

концентрации KCl от уровня 5 мМ, проводимость линейно увеличивается с ростом концентрации, достигая значения σ ~ 7 См/м при концентрации 0.5 М. Экспериментальные значения σ на участке 5 мМ – 0.5 М хорошо согласуются с теоретическими значениями, рассчитанными по формуле (6). При низких концентрациях электролита наблюдается расхождение экспериментальных и теоретических значений удельной проводимости. Причиной несоответствия экспериментальных и теоретических данных является наличие отрицательного поверхностного заряда $SiN_x$ (при нейтральных pH), обеспечивающего формирование области повышенной концентрации ионов $K^+$ с размерами $\lambda_{ДЭС}$ порядка нескольких десятков нм, как показано на рисунке 5. Конфигурация нанопоровой системы с $\lambda_{ДЭС} \gg d_{поры}$, характеризуется возникновением сплошной области повышенной концентрации ионов $K^+$ во внутреннем объеме поры и вносящей существенный вклад в проводимость структуры. Экспериментальные значения более чем на порядок превосходят теоретическую оценку, делая формулу (6) непригодной при низких концентрациях электролита. Помимо вклада в проводимость, наличие области повышенной концентрации противоионов приводит к усилению зарядовой селективности нанопоровой системы. По мере увеличения концентрации электролита, размеры ДЭС и их вклад в проводимость структуры снижается, приводя к сближению экспериментальных и теоретических данных в диапазоне концентраций 5 мМ – 0.5 М. Расчет эффективного диаметра поры по формуле (6) для концентраций электролита более 5 мМ, дает близкое значение к диаметру, полученному в ходе характеризации структуры в ПЭМ.

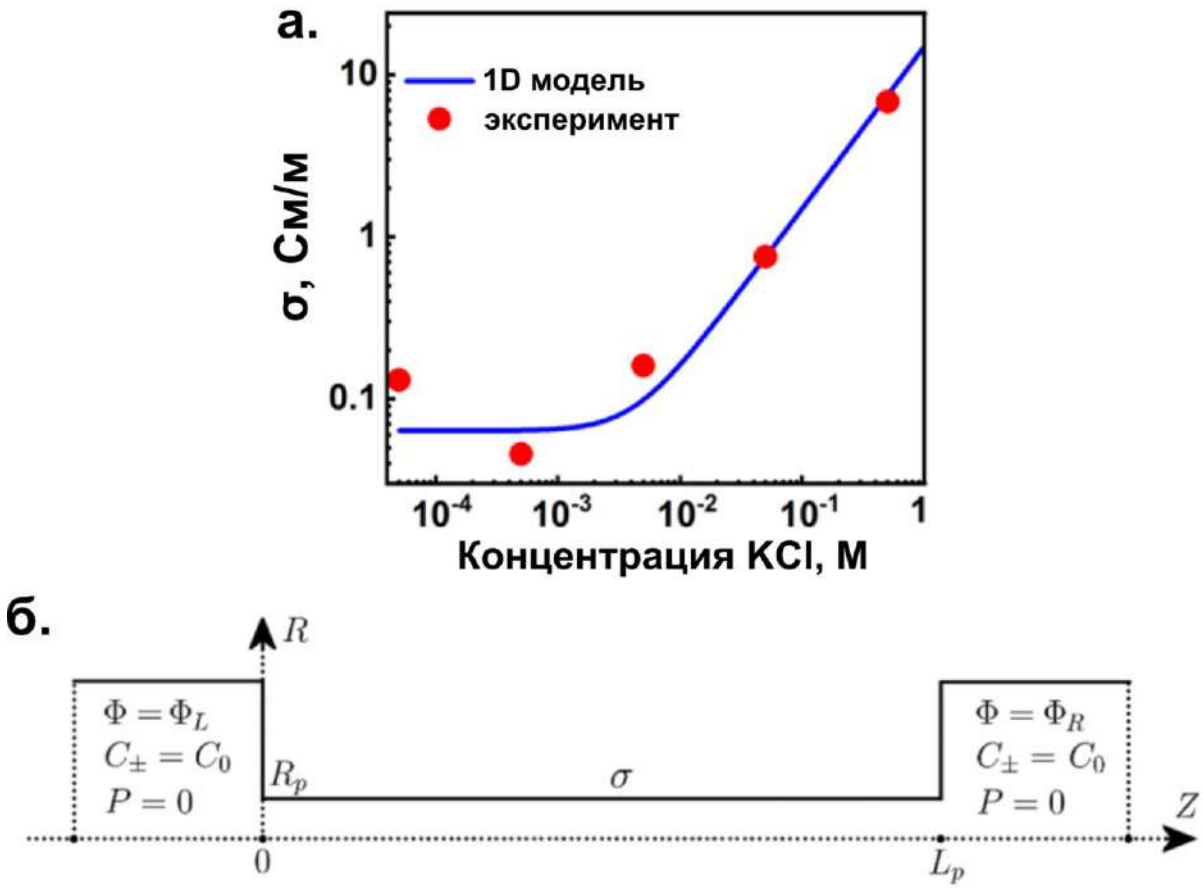


Рисунок 27 – а. Пример аппроксимации экспериментальной зависимости удельной проводимости одиночной $SiN_x$ нанопоры от концентрации электролита (красные точки) при помощи одномерной модели с постоянным потенциалом (синяя кривая). б. Модель цилиндрического наноканала, соединяющего собой два объема электролита.

Для эффективного моделирования транспортных свойств нанопор во всем диапазоне использованных концентраций электролита, экспериментальные данные были аппроксимированы одномерной моделью с постоянным потенциалом (см. рисунок 27 – а., синяя линия) [93]. Основанная на уравнениях Навье - Стокса, Нернста - Планка и Пуассона. В рамках данной модели одиночная нанопора представляется как цилиндрический канал (см. рисунок 27 – б.) с радиусом $R_p$ и длиной $L_p$. Канал нанопоры разделяет два объема одновалентного электролита одинаковой концентрации $C_0$ и одинакового давления $P_L = P_R = 0$. Приложенное электрическое поле формирует в объемах электролита потенциалы $\Phi_L$ и $\Phi_R$ (считаем $\Phi_L = 0$). Стенки канала обладают ненулевым электрическим

поверхностным зарядом, плотность которого обозначается как k. Рассматриваемая модель характеризуется однородным распределением величины концентрации ионов $C_{\pm}$, давления P и потенциала Ф в поперечной плоскости канала, что соответствует случаю, когда длина Дебая больше или сопоставима с радиусом поры $\lambda \gtrsim r_{поры}$. Удельная проводимость канала (нанопоры) σ задается как:

$$\sigma = G\frac{L_p}{\pi R_p^2} \tag{17}$$

Кроме того, задаются величины объемного потока $u_a$, общего потока ионов J и общего потока заряда ионов I′:

$$J = J_+ + J_-; \quad I' = J_+ + J_- \tag{18}$$

который связан с величиной ионного тока соотношением:

$$I = \pi R_p^2 F I' \tag{19}$$

Безразмерные переменные вводятся задаются как:

$$Z = Lz;\ \Phi = \frac{R_g T}{F}\varphi;\ C_{\pm} = C_0 c_{\pm};\ P = C_0 R_g T p \tag{20}$$

$$u_a = \frac{D_+}{L}u;\ J = \frac{D_+ C_0}{L}j;\ I' = \frac{D_+ C_0}{L}i \tag{21}$$

где $D_+$ и $D_-$ представляют собой коэффициенты диффузии для катионов и анионов раствора электролита. С помощью формул (9) и (20,21) можно выразить удельную проводимость канала $\sigma$ как:

$$\sigma = \frac{D_+ C_0 F^2}{R_g T}\frac{i}{\varphi_L - \varphi_R} \tag{22}$$

Безразмерная объемная плотность заряда, эквивалентная плотности поверхностного заряда k, определяется как:

$$X = \frac{2k}{C_0 F R} = c_- - c_+ \tag{23}$$

Из условия электронейтральности следует, что величина X противоположна по знаку объемной плотности ионного заряда $c = c_+ - c_-$. Модель с постоянным потенциалом связывает объемный поток, поток ионов и поток заряда ионов с градиентами давления, концентрации и потенциала:

$$u = \frac{1}{8\alpha}\left[-\frac{dp}{dz} + X\frac{d\varphi}{dz}\right] \quad (24)$$

$$j = cu + \frac{1}{2}\left[-(D+1)\frac{dc}{dx} + \left(X(D+1) + c(D-1)\right)\frac{d\varphi}{dz}\right] \quad (25)$$

$$i = -Xu + \frac{1}{2}\left[(D-1)\frac{dc}{dz} - \left(c(D+1) + X(D-1)\right)\frac{d\varphi}{dz}\right] \quad (26)$$

где $c = c_+ + c_-$ соответствует полной концентрации катионов и анионов; $D = \frac{D_-}{D_+}$ - отношение коэффициентов диффузии ионов;

$\alpha = \mu D_+ (C_0 R_g T R_p^2)^{-1}$ - безразмерный параметр, определяемый вязкостью раствора. Решая уравнения (17 - 19) относительно производных $\frac{dp}{dz}, \frac{dc}{dz}, \frac{d\varphi}{dz}$ становится возможным получить систему из трех дифференциальных уравнением. Условия на входе (z = 0) и выходе (z = 1) наноканала задаются следующим образом:

$$p(0) = c(0) - 2c_0;\ c(0) = \sqrt{X^2 + 4c_0^2};\ \varphi(0) = \varphi_0 \quad (27)$$

$$p(1) = c(1) - 2c_0;\ c(1) = \sqrt{X^2 + 4c_0^2};\ \varphi(1) = \varphi_1 \quad (28)$$

где $\varphi_0 - \varphi_L$ и $\varphi_1 - \varphi_R$ - скачки потенциала Доннана со обеих сторон канала, а соответствующие скачки давления и концентрации описываются первым и вторым отношениями в (27,28). Подставляя:

$$c_\pm(0) = c_0 \exp\left(\mp(\varphi_0 - \varphi_L)\right);\ c_\pm(1) = c_0 \exp\left(\mp(\varphi_1 - \varphi_R)\right) \quad (29)$$

в формулу (23), становится возможным выразить потенциалы $\varphi_0$ и $\varphi_1$ как:

$$X = 2c_0 \sinh(\varphi_0 - \varphi_L);\ X = 2c_0 \sinh(\varphi_1 - \varphi_R) \quad (30)$$

Для численного решения задачи, сперва задаются начальные приближения потоков u, j, i. Далее, с помощью отношений формулы (30) определяются потенциалы $\varphi_0$ и $\varphi_1$, а также задаются граничные условия выражения (27) при z = 0. Уравнения (24-26) интегрируются численно, а начальные приближения потоков u, j, i корректируются для удовлетворения граничных условий (30) и используются для интегрирования уравнений в следующей итерации. Итерации выполняются до тех пор, пока значения потоков с некоторой точностью не сойдутся к некоторым постоянным значениям. После этого, удельная проводимость σ вычисляется по

формуле (22). Необходимо отметить, что в случае $\lambda < r_{поры}$ (длина Дебая меньше радиуса поры), предположение об однородном распределении величины концентрации ионов $C_{\pm}$, давления P и потенциала Ф в поперечной плоскости канала больше не действительно. Однако, поскольку увеличение радиуса канала уменьшает величину объемной плотности заряда (23), эффекты размера канала все еще могут быть описаны представленной моделью. Подгонка данных под теоретическую модель выполняется путем минимизации суммы квадратов ошибок. Для подгонки по одному параметру используется метод золотого сечения, а для подгонки по нескольким параметрам используется метод Нелдера–Мида.

Как следует из рисунка 27 – а., одномерная моделью с постоянным потенциалом демонстрирует хорошее соответствие с экспериментальными данными на всем диапазоне исследуемых концентраций электролита. Также, из описанной модели было получено значение плотности поверхностного заряда для $SiN_x$ мембраны (стенок нанопоры) k = 0.8 мКл/м$^2$, а также эффективный диаметр поры d ~ 5 нм, что соответствует экспериментальным диаметрам нанопор, полученным с помощью ПЭМ.

Проведенный комплекс работ позволил отработать методику электрохимических измерений и получить экспериментальные подтверждения влияния поверхностных свойств $SiN_x$ мембраны на проводимость нанопоровых структур. Также продемонстрирована возможность управления транспортными и селективными свойствами нанопор при помощи контроля концентрации электролита. С помощью одномерной модели были рассчитаны характеристики одиночных $SiN_x$ нанопор, что может быть полезно для подбора условий экспериментов по исследованию молекулярного транспорта.

## 3.2 Управление ионной проводимостью одиночных $SiN_x$ нанопор с помощью лазерного оптического излучения

Возможность управления транспортными свойствами нанопор с помощью внешнего излучения востребована при изучении ионного транспорта в наноразмерных структурах так и в приложениях детектирования и анализа

одиночных биомолекул. Использование сфокусированного оптического излучения высокой мощности может помочь добиться существенного изменения уровня нанопорового ионного тока, как это было продемонстрировано в работах [81,94]. Поэтому, первым этапом работ по управлению ионным транспортом одиночных $SiN_x$ нанопор стало исследование влияния лазерного излучения на уровень ионного тока через пору.

Методика проведения оптических нанопоровых измерений подробно описана в разделе 2.4. Потенциостатические измерения проводятся в ячейке с оптическим доступом (рисунок 24 – в.). В качестве рабочего раствора используется KCl 1M + изопропанол (1:1), а в качестве источника излучения - лазерный диод ($\lambda$ = 632 нм) мощностью 100 мВт. Исследования проводились на одиночных $SiN_x$ нанопорах, диаметром d ~ 5 нм и длиной l = 40 нм. Излучение лазерного диода, с интенсивностью $P_{опт}$ ~ 10 кВт/см$^2$, фокусировалось на поверхность $SiN_x$ мембраны, в область одиночной поры, во время проведения потенциостатических измерений при помощи 50x объектива (Olympus LMPlanFL 50x). При облучении наблюдалось увеличение уровня ионного тока $I_{лазер}$ относительно уровня темнового тока $I_0$. При прекращении облучения фиксировалось возвращение значения ионного тока к первоначальному уровню.

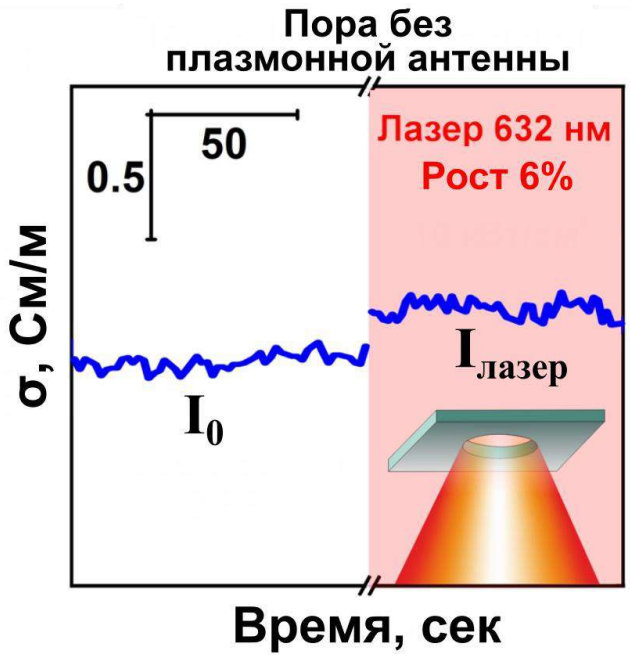


Рисунок 28 – Зависимость удельной проводимости одиночной нанопоры от лазерного излучения, левая часть зависимости соответствует состоянию темнового тока, правая - состоянию облучения области поры лазерным излучением.

Вызванный облучением рост уровня тока $I_{лазер}$ составил ~ 6% относительно $I_0$. Характерные зависимости удельной проводимости поры до и во время облучения, рассчитанные на основе потенциостатических измерений, представлены на рисунке 28. Здесь под $I_{лазер}$ и $I_0$ понимаются средние значения ионных токов на промежутке в несколько десятков секунд, исключая области с сильным влиянием переходных процессов в начале и после окончания облучения. Для контроля наблюдаемого эффекта, а также для лучшего понимания природы процессов, возникающих при облучении одиночных нанопор, оптические измерения были проведены также и для сплошных $SiN_x$ мембран, не продемонстрировавших различий между уровнями $I_0$ и $I_{лазер}$, что указывает на отсутствие влияния излучения на токи утечки мембран. На токовых кривых одиночных нанопор и сплошных мембран присутствуют переходные процессы, соответствующие началу и окончанию облучения. Эти процессы могут быть связаны с увеличением числа носителей заряда на поверхности $SiN_x$ мембран.

Необходимость экранирования фотоиндуцированного поверхностного заряда вызывает электрофоретическое движение противоионов из объема электролита по направлению к ДЭС мембраны. Направленное движение противоионов может вносить дополнительный вклад в измеряемый ионный ток. По мере восстановления электронейтральности на поверхности мембраны, дополнительный вклад в ионный ток будет уменьшаться, пока не вернется к уровню $I_0$.

Таким образом, эффект увеличения нанопорового ионного тока до уровня $I_{лазер}$ характерен только для нанопоровых образцов и может объясняться несколькими факторами. Во-первых, это локальный нагрев раствора в области нанопоры под действием падающего лазерного излучения. Локальный нагрев увеличивает проводимость раствора за счет уменьшения его вязкости и увеличения подвижности растворенных ионов [88]. Изменение температуры раствора может происходить только в области фокусировки лазерного луча (локальной области мембраны), это было подтверждено экспериментами по изучению температурной динамики раствора (методика описана в разделе 2.4). Измерения температуры объемного раствора с помощью термопары не выявили нагрева жидкости в процессе обучения мембраны лазером, как показано в табл. (1.а.). Таким образом, лазерное излучение может вызывать только локальный нагрев области нанопоры, не влияя на температуру объемного электролита в ячейке. Вторым фактором, влияющим на увеличение $I_{лазер}$, может являться увеличение фотоиндуцированного заряда на стенках нанопоры при воздействии на них оптического излучения, что аналогично переходным процессам на поверхности $SiN_x$ мембраны. Более того, аккумулирование дополнительных носителей заряда в ограниченном пространстве внутреннего объема поры приводит к увеличению размеров ДЭС, а значит и увеличению концентрации противоионов. Увеличение концентрации ионов электролита во внутреннем объеме нанопоры приводит к росту ее удельной проводимости.

Таблица 1 – Зависимость температуры раствора в измерительной ячейке от времени облучения области нанопоры сфокусированным лазерным излучением $\lambda = 632$ нм, $P_{опт} \sim 10$ кВт/см$^2$

| Продолжительность облучения, сек | Температура раствора электролита, ℃ |
|---|---|
| 0 | 23.2 |
| 60 | 23 |
| 120 | 22.9 |
| 180 | 22.8 |
| 300 | 22.8 |
| 600 | 22.9 |
| 900 | 23.1 |

В ходе проведенных работ была отработана метод проведения оптических нанопоровых измерений. Кроме этого, было реализовано оптическое управление транспортными свойствами нанопоровых структур. Наблюдалось увеличение уровня ионного тока на 6% при облучении нанопоры сфокусированным лазерным излучением мощностью 10 кВт/см$^2$.

### 3.3 Исследование свойств плазмонных Au антенн-бабочек

Несмотря на развитие методик управления ионным транспортом одиночных $SiN_x$ нанопор с помощью оптического излучения, сенсорные свойства таких структур могут быть улучшены благодаря методам функционализации и модификации твердотельных нанопор. Значительная часть данных методов существенно изменяют геометрию, транспортные или поверхностные свойства одиночных нанопор, являясь узкоспециализированным инструментом, направленным на решение определенной задачи. Особый интерес представляют элементы нанофотоники (плазмоники), при интеграции которых с нанопоровыми структурами становится возможной реализация управляемого и обратимого

воздействия на характеристики ионного и молекулярного транспорта. Плазмонные наноразмерные антенны-бабочки являются одним наиболее распространенных и универсальных вариантов формирования плазмонных нанопор. В случае возбуждения поверхностного плазмонного резонанса с помощью оптического излучения, такие структуры способны локализовывать электромагнитное поле в области одиночной нанопоры, что может приводить как к локальному разогреву, так и к изменению конфигурации ДЭС во внутреннем объеме поры. Успешная реализация сенсора на основе одиночной плазмонной нанопоры требует: моделирования антенны-бабочки для анализа ее оптических свойств; отработки метода формирования плазмонных антенн на свободноподвешенных $SiN_x$ мембранах; проведения комплекса экспериментов по управлению транспортными свойствами пор с помощью поверхностного плазмонного резонанса, возбуждаемого в антеннах бабочках оптическим излучением.

**Моделирование свойств плазмонной Au наноантенны**

Работы по численному моделированию сформированных плазмонных антенн-бабочек (метод изготовления подробно описан в разделе 2.2) были проведены с использованием программного обеспечения Comsol Multiphysics в пакете конечных разностей в частотной области (finite-difference frequency-domain – FDFD). Плазмонная антенна-бабочка представляет собой два Au равнобедренных треугольника, направленных вершинными углами друг к другу. В качестве источника света рассматривалась плоская электромагнитная волна, поляризованная вдоль плеч антенны. Ширина сфокусированного лазерного луча (по его интенсивности) может быть рассчитана как $2 \times \frac{\lambda}{\pi} \times NA = 805$ нм, где $\lambda$ = 632 нм (длина волны лазера), NA = 0.5 соответствует числовой апертуре используемого объектива. Объекты (например, антенна) размерами $\lesssim$ 600 нм полностью находится в этом поле, а отклонение интенсивности падающего на объект излучения не превышает 20%. кроме того, глубина фокусировки в данной системе составляет > 2 мкм, что значительно превышает моделируемую высоту

плазмонных антенн h = 20 нм. Комплекс данных факторов позволяет рассматривать падающее лазерное излучение как плоскую волну.

Полный модуль электрического поля вблизи зазора антенны в $SiN_x$ мембране с интегрированной порой вычисляется по упрощенной формуле

$$\lambda = \frac{2nL}{m} \tag{31}$$

где L — длина антенны, n — эффективный показатель преломления системы, а m — порядок резонанса. Выражение (31) может быть использовано для анализа спектрального положения основных резонансов антенн-бабочек различных размеров. Отметим, что эффективный показатель преломления зависит от формы антенны, свойств металла и окружающей среды, поэтому в нашем случае n ≈ 1,3-2. Для резонанса первого порядка в видимом спектральном диапазоне, наноантенна должна иметь размеры ≲ 300 нм, что является непростой технологической задачей. При увеличении размера антенн до ~ 600 нм, с технологической точки зрения появляется возможность формирования таких структур не только методом электронно-лучевой литографии, но и потенциально с использованием УФ-подходов высокого разрешения. Для антенн таких размеров резонанс первого порядка будет находится в промежутке λ = 1200-1400 нм, однако также будут поддерживаться резонансы высших порядков в видимом диапазоне, возбуждаемые лазерным или широкополосным излучением. На рисунке 29 – а. представлена спектр усиления локального электрического поля вблизи нанопоры. Резонанс первого порядка находится в среднем ИК-диапазоне, а область существенного усиления электрического поля расположена в зазоре между треугольниками (рисунок 29 – б.). Также на спектре рисунка 29 – а. наблюдаются 2 пика в видимом и ближнем ИК-диапазонах. Распределение электрического поля на этих длинах волн представлено на рисунке 29 – в,г. Таким образом, спектральный пик λ ~ 1430 нм соответствует фундаментальной моде антенны, а пики λ ~ 773 и 657 нм соответствуют локализованным плазмонным модам. Известно, что Au пленки имеют довольно широкий плазмонный спектр (600 - 800 нм) в видимой области оптического излучения [95]. Расчеты показывают, что обе плазмонные моды

рассматриваемой антенны-бабочки лежат в широкой полосе плазмонного спектра Au пленки, а их электрические поля сосредоточены не только в зазоре, но и по периферии треугольников, что характерно для поверхностного плазмонного резонанса. Отметим, что максимальная концентрация электрического поля по-прежнему локализуется в зазоре, что важно для нанопоровых приложений. Из этого следует, применяемые в работе Au плазмонные антенны-бабочки обеспечивают существование оптических мод в видимом спектральном диапазоне, а также позволяют осуществлять более простое технологическое изготовление таких структур.

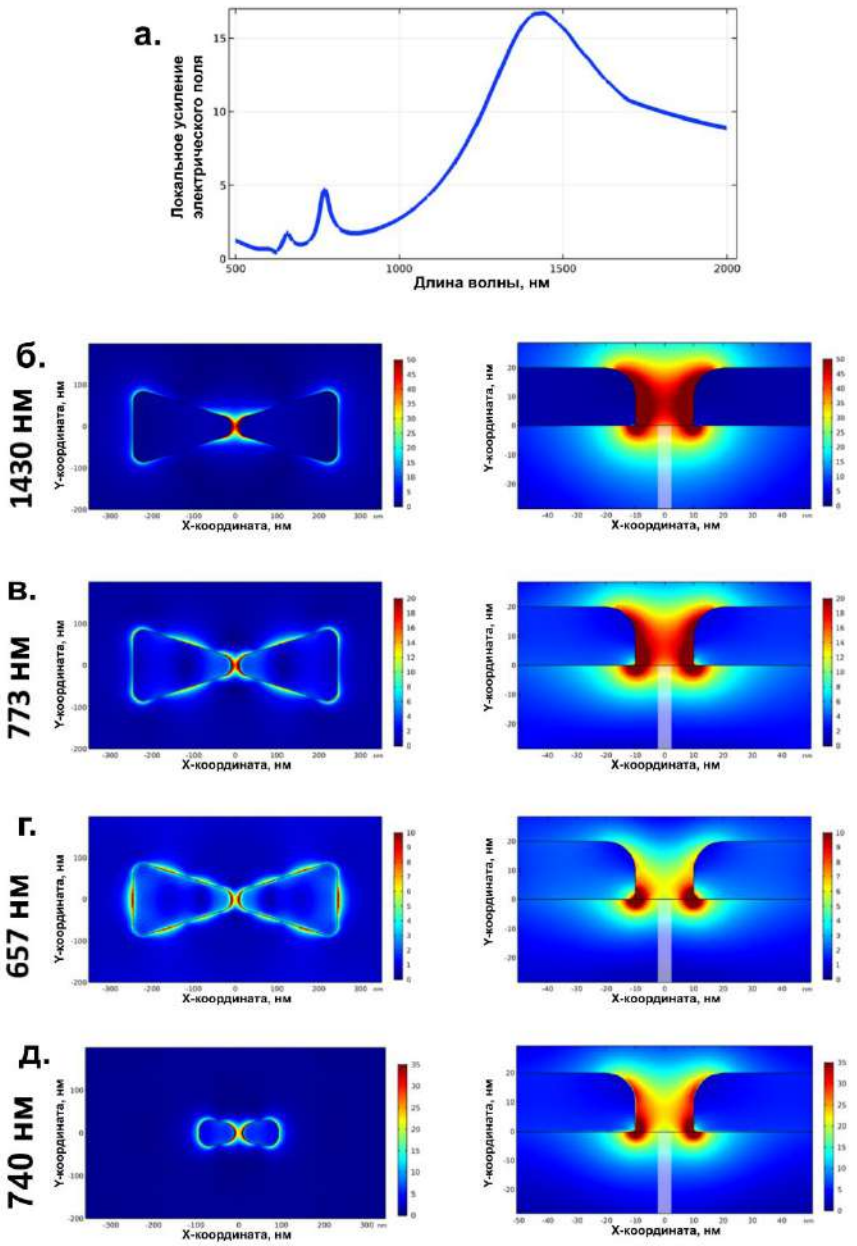


Рисунок 29 – а. Рассчитанная зависимость локального усиления электрического поля в области нанопоры от длины волны падающего излучения для плазмонной антенны размером ~ 600 нм. б.-д. Распределение электрического поля внутри наноантенны (слева) и в области нанопоры (справа), на длинах волн 1430 (б), 773 (в) и 657 (г) нм для плазмонной антенны размером ~ 600 нм, на длине волны 740 нм (д) для плазмонной антенны размером ~ 300 нм.

При сравнении антенн-бабочек с различными линейными размерами и обладающими резонансы в ИК и видимом спектральных диапазонах (см. рисунок 29 – б-д), антенна меньшего размера фокусирует электромагнитное поле не только

вблизи поры, но и в зазоре над ней, что приводит к паразитному нагреву системы. Антенна большего размера, локализует поля в приповерхностном слое мембраны, позволяя уменьшить влияние паразитного локального нагрева раствора. Из результатов моделирования следует что коэффициент усиления электромагнитного поля, интегрированного по всей длине нанопоры, равен 1,4−1,5.

## 3.4 Влияние лазерного излучения на ионную проводимость одиночной плазмонной нанопоры

Плазмонные Au антенны-бабочки были сформированы на свободноподвешенной $SiN_x$ мембране, после чего в зазоре между плечами антенны изготавливалась одиночная нанопора (см. рисунок 30 – а). Методика формирования плазмонных антенн подробно описана в разделе 2.2. Спектры рассеяния плазмонной антенны-бабочки до и после формирования одиночной нанопоры в зазоре между треугольниками были измерены в темнопольном режиме (подробности методики также описаны в разделе 2.2). Типичный спектр рассеяния Au антенны-бабочки представлен на рисунке 30 – б. и демонстрирует широкий резонансный пик [96], расположенный в диапазоне длин волн 600−800 нм, что согласуется с результатами численного моделирования и указывает на то, что изготовленные структуры обладают плазмонными свойствами. Как видно из рисунка, спектры для антенны с порой и без неё практически идентичны. Таким образом, можно сделать вывод о том, что наличие поры не влияет на спектр рассеяния плазмонной антенны.

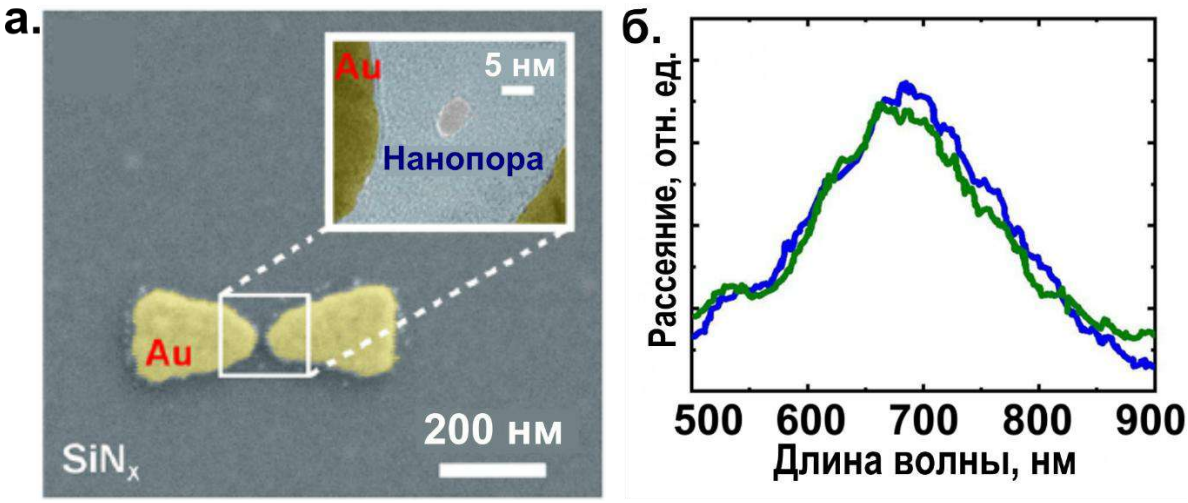


Рисунок 30 – а. СЭМ изображение сформированной антенны бабочки (окрашена желтым), вставка (ПЭМ изображение) демонстрирует место расположения одиночной поры в зазоре антенны. б. Темнопольный спектр рассеяния плазмонной антенны без нанопоры (синяя кривая) и с одиночной нанопорой d ~ 5 нм в зазоре антенны (зеленая кривая).

Методы проведения измерений ионного тока, а также методы проведения оптических измерений плазмонных нанопор полностью идентичны методам для обычных нанопор и подробно описаны в разделе 2.4. Сперва были проведены исследования зависимости проводимости одиночных плазмонных нанопор (диаметром ~ 5 нм) от концентрации электролита KCl в диапазоне от 0.05 мМ до 0.5 М. Для этого была проведена серия потенциостатических измерений по 8 мин каждое в диапазоне напряжений от −300 мВ до +300 мВ В с шагом 100 мВ. Типичная ВАХ плазмонной нанопоры представлена на рисунке 31 – а., ее линейных характер обусловлен симметричной формой нанопоры, отсутствием загрязнений и полным смачиванием нанопоры раствором. Кроме того, можно сделать вывод о том, что наличие Au антенны-бабочки не препятствует смачиванию нанопоры. На основании ВАХ была построена зависимость удельной проводимости плазмонной нанопоры от концентрации электролита KCl (см. рисунок 31 – б.). Полученная зависимость аналогична зависимости одиночной $SiN_x$ нанопоры без плазмонной антенны (см. рисунок 27 – а.), а небольшие различия в абсолютных значениях проводимости объясняются небольшими различиями в геометрии и размерах

исследуемых пор. Таким образом, плазмонная антенна-бабочка практически не влияет на транспортные характеристики нанопоровой структуры в отсутствии падающего излучения.

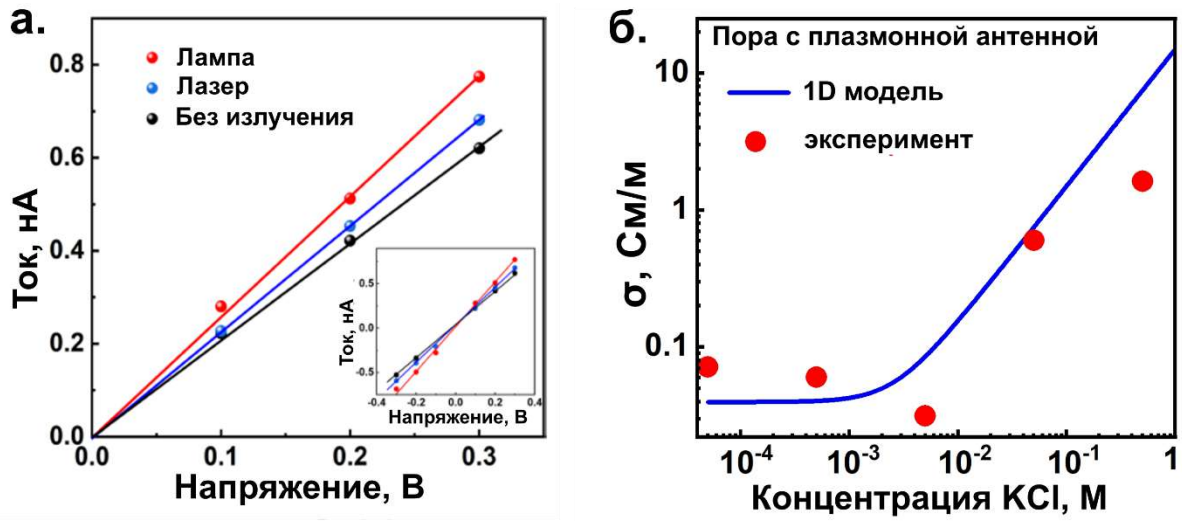


Рисунок 31 – а. Типичные ВАХ плазмонной нанопоры без облучения (черная), при облучении сфокусированным лазерным излучением (синяя), при облучении широкополосным излучением галогенной лампы (красная), на вставке показана также обратная ветвь ВАХ. б. Аппроксимация экспериментальной зависимости удельной проводимости одиночной нанопоры с Au плазмонной антенной от концентрации электролита (красные точки) при помощи одномерной модели с постоянным потенциалом (синяя кривая).

Результаты аппроксимации экспериментальных данных с помощью одномерной модели с постоянным потенциалом позволяют определить поверхностный заряд на стенках плазмонной поры k = 0.5 мКл/м$^2$ и ее эффективный диаметр d ~ 5 нм что хорошо согласуется с экспериментальным диаметром, полученным с помощью ПЭМ. Разница в значениях плотности поверхностного заряда k обычной и плазмонной пор (0.8 мКл/м$^2$ и 0.5 мКл/м$^2$ соответственно) может объясняться небольшими различиями в геометрии данных структур.

Далее было исследовано влияние лазерного излучения на величину удельной проводимости плазмонных нанопор. Лазерное излучение с длиной волны λ = 632 нм и плотностью мощности 10 кВт/см$^2$, сфокусированное в области плазмонной

нанопоры, вызывая рост удельной проводимости структуры на 10% (см. рисунок 32 – а), что на ~ 66% выше чем при воздействии лазерного излучения на обычную нанопору без плазмонной антенны.

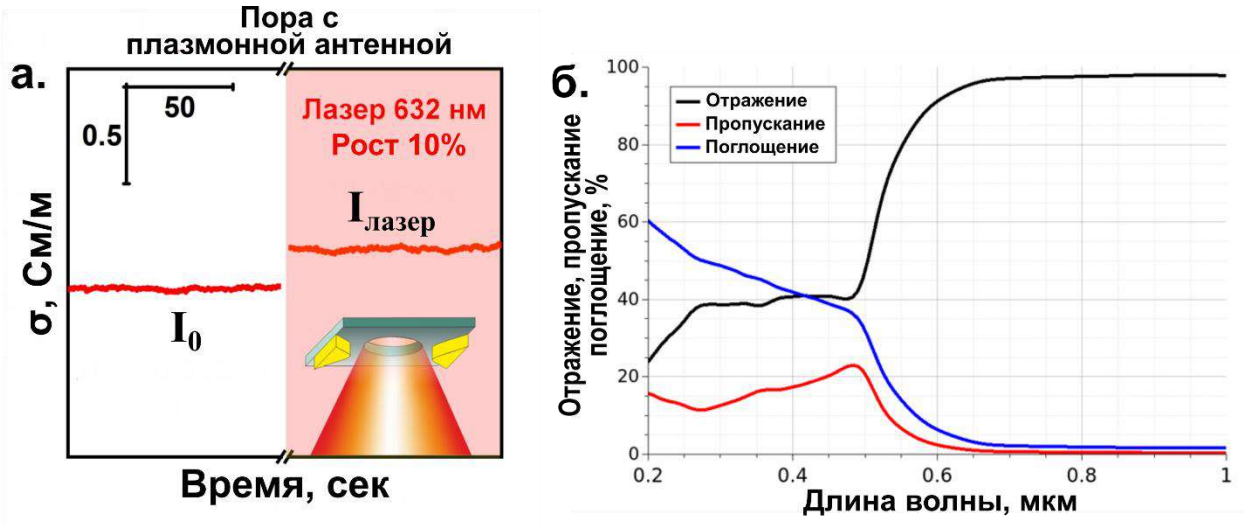


Рисунок 32 – а. Зависимость удельной проводимости одиночной нанопоры с Au плазмонной антенной от сфокусированного лазерного излучения, левая часть зависимости соответствует состоянию темнового тока, правая - состоянию облучения области поры лазерным излучением. б. Оптические свойства слоя Au толщиной 20 нм в зависимости от длины волны падающего излучения.

Отметим, что фактор усиления проводимости поры (~66%) сравним с коэффициентом усиления электромагнитного поля, полученным в ходе моделирования (~50%). Рост проводимости плазмонных нанопор может быть связан с эффектом локального нагрева в области нанопоры и эффектом возбуждения поверхностных состояний $SiN_x$ мембраны, приводящего к появлению дополнительного поверхностного заряда на стенках поры.

Как и в случае с обычными нанопорами, лазерное излучение не вызывает объемного нагрева раствора электролита в измерительной ячейке. Однако, плазмонная антенна-бабочка может реализовывать более эффективный локальный нагрев области нанопоры за счет поглощения и последующего рассеяния оптического излучения. Для детального исследования этого эффекта были проанализированы спектры отражения, пропускания и поглощения тонкого слоя золота, представленные на рисунке 32 – б. [97]. Видно, что золото эффективно

поглощает свет с $\lambda < 530 - 550$ нм. Это означает что нагрев Au антенны-бабочки при ее облучении лазерным излучением ($\lambda = 632$ нм) должен быть минимальным. Исходя из этого, можно предположить, что локальный нагрев области поры антенной-бабочкой не является доминирующим фактором в процессе оптического управления проводимостью плазмонной нанопоровой структуры.

Поскольку плазмонная антенна-бабочка, при возбуждении в ней плазмонного резонанса, фокусирует электромагнитное излучение не только в локальной области раствора над нанопорой, но и в приповерхностном слое $SiN_x$, как показано на рисунке 29 – г., локализованное электрическое поле способно эффективно возбуждать поверхностные электронные состояния как в области входа в нанопору, так и на ее стенках. Это приводит к увеличению поверхностного заряда $SiN_x$ и более эффективному управлению нанопоровым ионным транспортом с помощью оптического излучения.

Используемая в работе геометрия плазмонных антенн-бабочек позволяет эффективно фокусировать оптическое излучение в области поры. Именно локализация электромагнитного поля в приповерхностной области $SiN_x$ плазмонными антеннами является доминирующим фактором более эффективного управления удельной проводимостью в плазмонных нанопорах.

## 3.5 Управление ионной проводимостью одиночных нанопор с помощью широкополосного оптического излучения

Методика управления транспортными свойствами одиночных $SiN_x$ нанопор с помощью сфокусированного лазерного излучения демонстрирует принципиальную возможность использования оптического излучения для обратимого изменения транспортных свойств нанопор. Однако применение лазерного излучения высокой мощности не всегда возможно при работе с биологическими объектами. Предположительно, влияние сфокусированного лазерного излучения на транспортные характеристики нанопор складывается из эффектов локального нагрева раствора и фотовозбуждения дополнительного поверхностного заряда на поверхностных электронных состояниях,

локализованных на стенках поры. Исходя из этого, варианты развития методики оптического управления нанопоровым транспортом рассматривались в рамках усиления влияния данных эффектов. Усиление эффекта локального нагрева раствора в области падения лазерного пучка может приводить к эффекту паразитной нуклеации пузырей газа в растворе, а также ограничивает применимость метода в работе с биологическими объектами, проявляющими повышенную чувствительность к температуре окружающей среды. Кроме того, усиление нагрева требует использования более мощного источника излучения, а также улучшения системы фокусирования пучка в области мембраны (поры), что может создать дополнительные трудности в практической реализации.

Усиление эффекта накопления фотоиндуцированного заряда на стенках поры выглядит более перспективным вариантом, поскольку теоретически может реализовываться не только повышением интенсивности падающего излучения, но и изменением его спектрального состава. Так, заменив лазерный диод широкополосным источником оптического излучения, можно ожидать увеличения поверхностного заряда стенок поры за счет фотовозбуждения дополнительных поверхностных электронных состояний.

В ходе работ по развитию метода управления ионной проводимостью пор с помощью широкополосного излучения, был проведен комплекс оптических измерений одиночных $SiN_x$ нанопор, методика которых подробно описаны в разделе 2.4. В качестве источника излучения использовалась галогенная лампа микроскопа Olympus U-LH100L-3 ($\lambda$ = 400 - 1000 нм), обеспечивающая облучение нанопорового образца через trans- объем (рисунок 24 – в.) с интенсивностью $P_{опт}$ ~ 35 мВт/см$^2$. В качестве буферного раствора электролита использовалась смесь KCl 1M + изопропанол (1:1). В остальным проведенные потенциостатические измерения аналогичны измерениям с лазерным излучением.

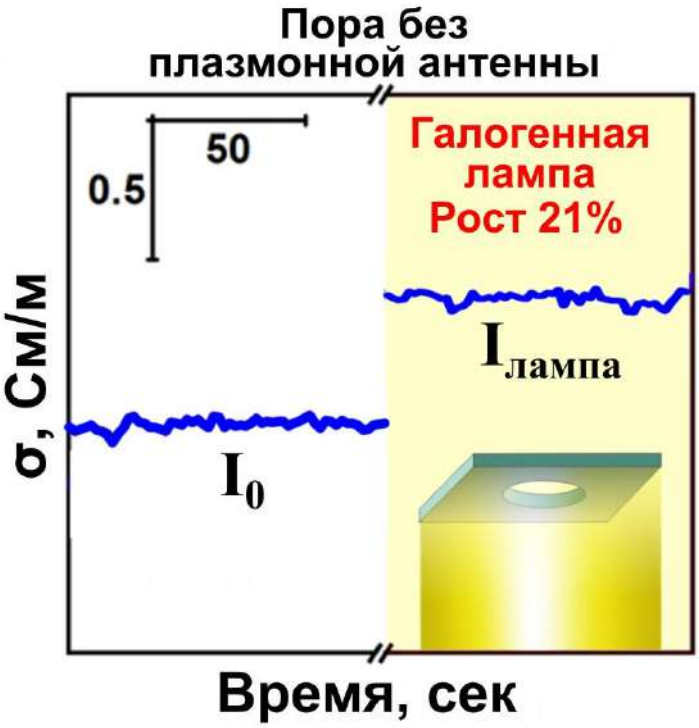


Рисунок 33 – Зависимость удельной проводимости одиночной нанопоры от широкополосного излучения галогенной лампы, левая часть зависимости соответствует состоянию темнового тока, правая - состоянию облучения области поры широкополосным излучением.

При облучении нанопорового образца рассеянным широкополосным излучением галогенной лампы, наблюдается значительный рост удельной проводимости $SiN_x$ поры до ~ 21%, как показано на рисунке 33. Как и в случае с лазерным излучением, моменты начала и окончания облучения сопровождается кратковременными переходными процессами, что может указывать на идентичный механизм воздействия монохроматического и широкополосного оптического излучений на поверхностный заряд $SiN_x$ нанопор. С другой стороны, широкополосное оптическое излучение полностью засвечивает всю электрохимическую ячейку, приводя к нагреву всего объема электролита, а не только локальной области мембраны. Динамика нагрева раствора под действием широкополосного излучения измерялась с помощью термопары (метод подробно описан в разделе 2.4), установленной в cis- объем ячейки. Результаты измерений, представленные в таблице 2, демонстрируют постепенный нагрев раствора с

24,4 ℃ до 30,4 ℃ за 50 минут облучения (таблица 2). За первые 3 минуты температура раствора увеличивается на 2,1 ℃, что является достаточно малым изменением, которое не может быть причиной столь серьезного роста удельной проводимостию.

Таблица 2 – Зависимость температуры раствора в измерительной ячейке от продолжительности облучения широкополосным излучением галогенной лампы $\lambda$ = 400 - 1000 нм, $P_{опт} \sim 35$ мВт/см$^2$

| Продолжительность облучения, сек | Температура раствора электролита, ℃ |
|---|---|
| 0 | 24,4 |
| 60 | 25,6 |
| 120 | 26,2 |
| 180 | 26,5 |
| 300 | 27 |
| 600 | 28,1 |
| 900 | 28,3 |
| 1200 | 28,7 |
| 1500 | 29,1 |
| 1800 | 29,7 |
| 2400 | 29,9 |
| 3000 | 30,4 |

Таким образом, медленный рост температуры раствора под действием излучения позволяет предположить, что значительный вклад в наблюдаемый рост уровня удельной проводимости поры вносит эффект фотовозбуждения дополнительного поверхностного заряда на стенках нанопоры. Для дополнительного исследования влияния эффектов увеличения поверхностного заряда стенок поры на ионный транспорт, были проведены эксперименты с использованием оптических фильтров, устанавливаемых между лампой и измерительной ячейкой (порой). На первом этапе с помощью оптических фильтров

были отсечены инфракрасный (ИК) и ультрафиолетовый (УФ) диапазоны излучения, соответствующие максимумам поглощения воды (водных растворов) [98]. Излучение со спектром $\lambda = 350 - 750$ нм, вызывает рост удельной проводимости $SiN_x$ нанопоры на ~ 8%, что превышает эффект от лазерного излучения (6%). Изменение влияния оптического излучения на уровень удельной проводимости с 21% до 8% может быть обусловлено снижением интенсивности светового потока, а также минимизацией эффекта нагрева раствора и эффекта возбуждения поверхностных электронных состояний в ИК и УФ диапазонах. Последнее подтверждается исследованиями распределения электронных состояний в запрещенной зоне тонких пленок $SiN_x$, полученных методом CVD [99]. На рисунке 34 – в. схематически показано распределение локальной плотности электронных состояний (ЛПЭС) на поверхности $SiN_x$ при этом видно наличие энергетических уровней в запрещенной зоне, обусловленных наличием дефектов на поверхности пленки (мембраны). Таким образом, тонкие аморфные $SiN_x$ пленки обладают значительным количеством поверхностных состояний в запрещённой зоне, соответствующих оборванным состояниям Si, а также связанных с N центрам. Широкополосное излучение низкой интенсивности может оказывать более выраженное влияние на возбуждение поверхностных состояний в слое $SiN_x$ по сравнению с мощным лазерным излучением, поскольку способно воздействовать на энергетические уровни запрещенной зоны в широком диапазоне энергий. В то же время лазерное излучение способно воздействовать на поверхностные состояния лишь в узкой спектральной области. Для дополнительного исследования влияния спектра падающего излучения на эффект увеличения удельной проводимости, были проведены измерения с использованием фильтров низких ($\lambda >$ 600 нм) и высоких ($\lambda <$ 600 нм) частот. Фильтры выбраны таким образом, что энергия падающего излучения разделяет запрещенную зону $SiN_x$ на примерно равные участки. Оптические фильтры практически одинаково влияют на проводимость пор, как это показано на рисунке 34 – а,б.

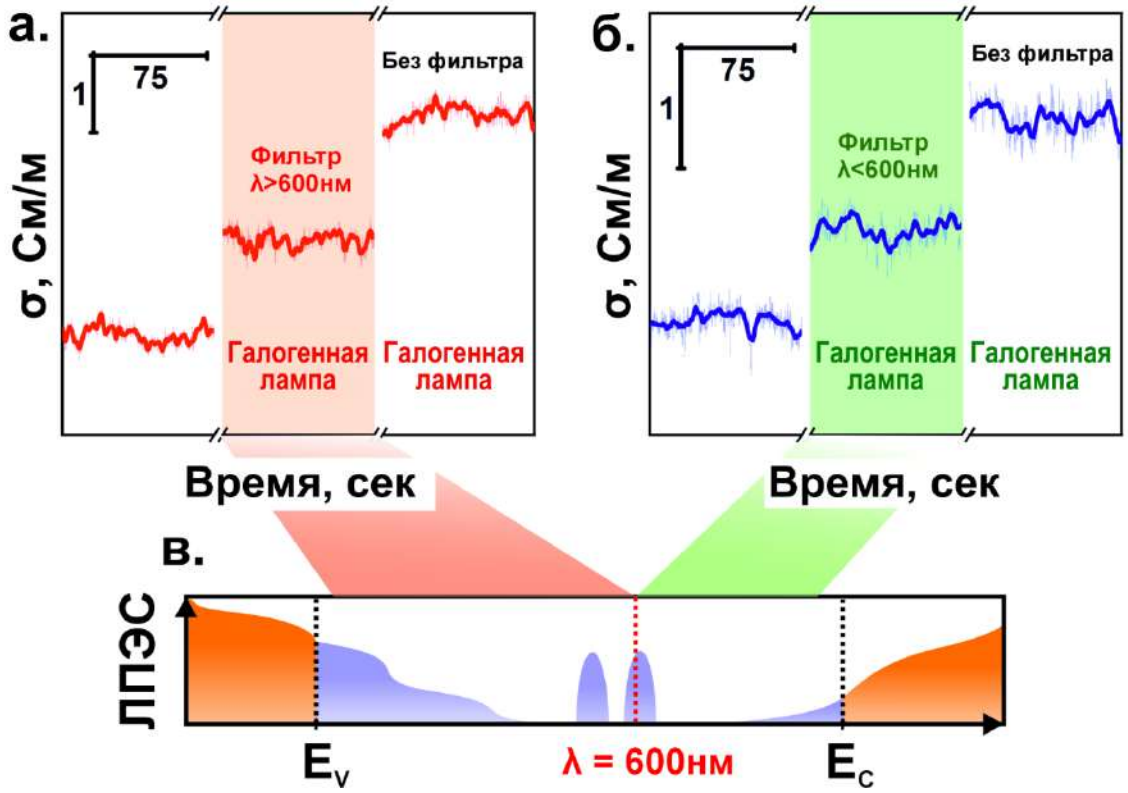


Рисунок 34 – а-б. Зависимости удельной проводимости одиночной нанопоры от широкополосного излучения галогенной лампы с использованием фильтров низких и высоких частот. в. Распределение локальной плотности электронных состояний (ЛПЭС) в запрещенной зоне $SiN_x$.

В ходе проведенных работ была отработана методика проведения оптических нанопоровых измерений с использованием галогенной лампы, а также различных оптических фильтров. Полученные результаты демонстрируют значительно более выраженное влияние широкополосного излучения на уровень удельной проводимости, по сравнению с монохроматическим излучением лазерного диода. Значительная разница сохраняется и при использовании оптических фильтров, блокирующих часть спектрального диапазона падающего света. Подобный эффект может объясняться фотовозбуждением распределенных поверхностных состояний в запрещенной зоне тонкой пленки $SiN_x$ и как следствие дополнительной адсорбции заряда на стенках поры, что приводит к росту концентрации ионов во внутреннем объеме поры и росту удельной проводимости. Возможность эффективного управления проводимостью нанопоры при помощи

широкополосного излучения малой интенсивности, не приводящим к значительному локальному нагреву области нанопоры или объемному нагреву буферного раствора электролита, может найти широкое применение в приложениях биологических исследований.

### 3.6 Управление ионной проводимостью одиночных плазмонных нанопор с помощью широкополосного оптического излучения

В работе было исследовано влияние широкополосного излучения галогенной лампы на проводимость одиночных плазмонных $SiN_x$ нанопор. Как показано на рисунке 35 – а., рассеянное излучение с плотностью мощности ~ 35 мВт/см$^2$ вызывает 35% увеличение проводимости плазмонной поры, что на ~ 66% больше аналогичного эффекта для обычной нанопоры.

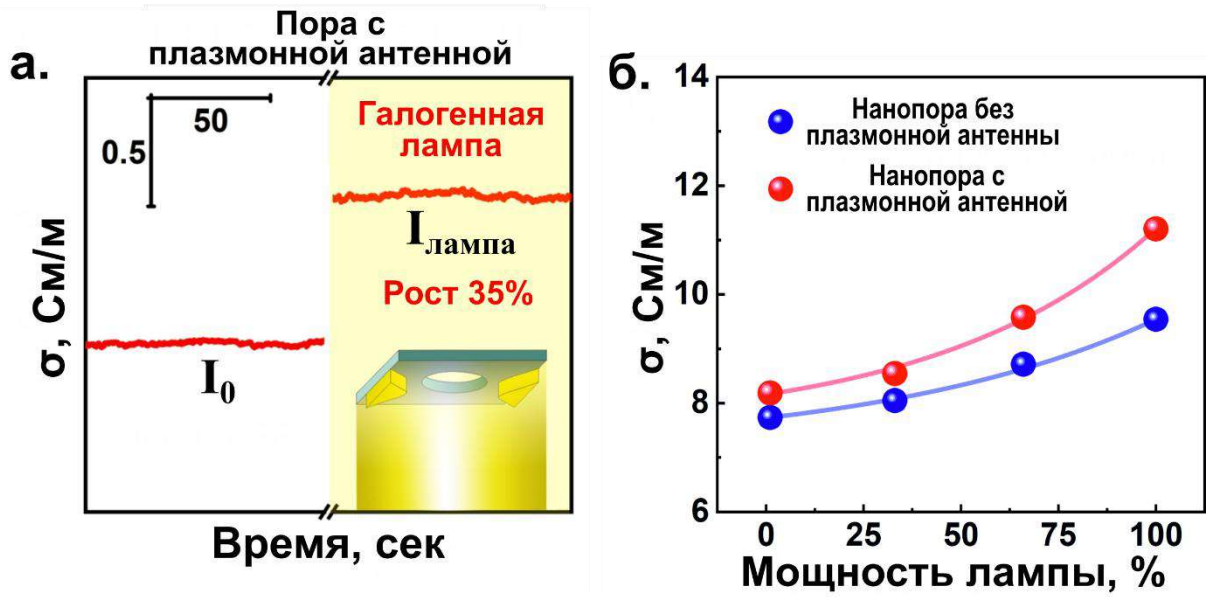


Рисунок 35 – а. Зависимость удельной проводимости одиночной нанопоры с Au плазмонной антенной от широкополосного излучения галогенной лампы, левая часть зависимости соответствует состоянию темнового тока, правая - состоянию облучения области поры широкополосным излучением. б. Зависимость удельной проводимости одиночной нанопоры без/с Au плазмонной антенны от мощности галогенной лампы.

Как и в случае с обычной нанопорой, рост проводимости плазмонной поры при ее облучении широкополосным излучением может объясняться эффектами объемного нагрева раствора и фотовозбуждения поверхностных состояний на стенках $SiN_x$ нанопоры. Объемный нагрев раствора для обычной и плазмонной нанопор должен быть идентичным вследствие одинаковых измерительных ячеек, растворов электролита, мощности и спектрального состава падающего излучения. Кроме объемного нагрева, плазмонная антенна-бабочка может вызывать и локальный нагрев раствора в области нанопоры благодаря поглощению части спектра с $\lambda$ <530−550 нм в тонком слое Au (см. рисунок 32 – б.). Тем не менее низкая интенсивность падающего излучения в сочетании с высокой теплоемкостью раствора электролита должны ограничивать локальный нагрев области поры.

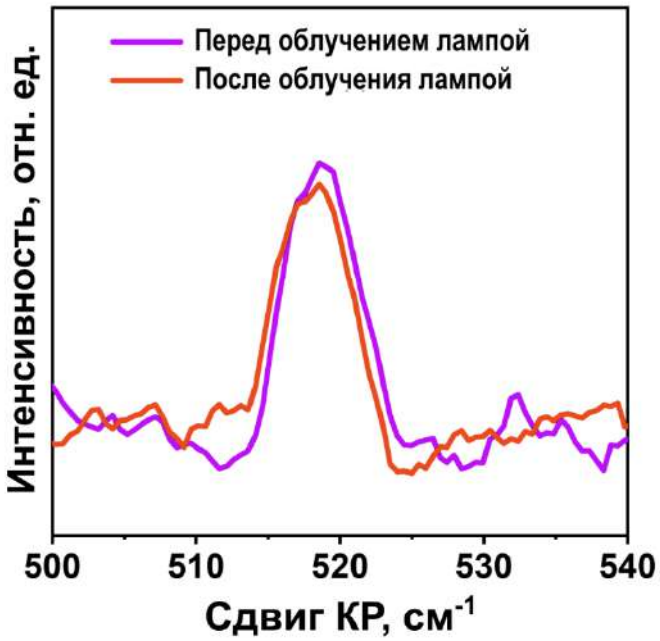


Рисунок 36 – КР спектр Si наночастицы на поверхности $SiN_x$ свободноподвешенной мембраны перед и после облучения галогенной лампой.

Далее, было проведено дополнительное исследование влияния широкополосного излучения на локальный нагрев локализованных на поверхности наноструктур, с целью оценки возможного локального нагрева областит нанопоры. Для этого, на свободно подвешенную $SiN_x$ мембрану (без поры) помещалась Si наночастица диаметром d ~ 200 нм, полученная методом лазерной абляции.

Поскольку КР отклик Si наночастиц зависит от их температуры [92], спектр КР рассеяния наночастицы был измерен до и после воздействия широкополосного излучения по методике, подробно описанной в разделе 2.4. Воздействие излучения не приводит к существенному сдвигу измеренного КР спектра (см. рисунок 36), что указывает на отсутствие нагрева частицы. Отметим, что данный метод обеспечивает высокую точность только в области относительно высоких температур и не полностью применим для рассматриваемой системы.

Кроме эффектов нагрева, необходимо изучить также и механизмы фотовозбуждения поверхностных состояний в запрещенной зоне $SiN_x$ мембран. Исходя из результатов моделирования плазмонных структур можно предположить что широкополосное излучение галогенной лампы может возбуждать локализованные плазмонные моды ($\lambda \sim 773$ и $\sim 673$ нм) Au антенны-бабочки, как это показано на рисунке 29 – в,г. Таким образом, плазмонная антенна более эффективно локализует широкополосное излучение в сравнении с излучением лазерного диода. Локализация нескольких мод падающего света в приповерхностном слое $SiN_x$ позволяет лучше возбуждать поверхностные состояния в видимых частях спектра, соответствующих максимумам локальной плотности электронных состояний аморфных пленок $SiN_x$ (см. рисунок 34 – в.). Также было изучено влияние мощности галогенной лампы на амплитуду увеличения проводимости. Как показано на рисунке 35 – б., увеличение мощности освещения приводит к росту проводимости как обычной, так и плазмонной нанопоры, позволяя эффективно управлять ионным транспортом с помощью изменения мощности падающего излучения.

В ходе проведенных работ было продемонстрировано, что наибольшей эффективности при оптическом управлении проводимостью одиночной нанопоры удается добиться с помощью облучения широкополосным излучением нанопоры с интегрированной плазмонной Au антенной-бабочкой (см. рисунок 37). Анализ научных публикаций по данной теме позволяет говорить о том, что представленный в работе метод позволяет эффективно управлять ионной проводимостью одиночных пор, не прибегая к использованию лазеров большой

мощности. Воздействие широкополосного излучения малой интенсивности минимизирует локальный нагрев области нанопоры, не приводит к значительному разогреву объема электролита, а также дает возможность модулировать величину поверхностного заряда на стенках нанопоры. Перечисленные особенности метода управления ионным транспортом могут быть чрезвычайно полезны в приложениях детектирования и анализа биологических соединений.

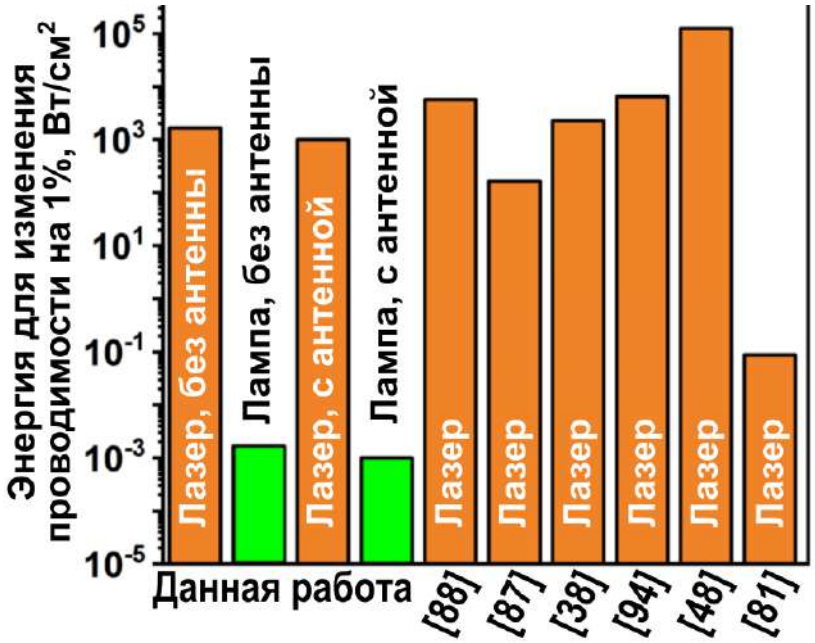


Рисунок 37 – Эффективность различных способов оптического воздействия на проводимость одиночных твердотельных нанопор.

## 3.7 Потенциостатические исследования ионной проводимости пористых $Al_2O_3$ и $C/Al_2O_3$ мембран

Развитый в ходе работ с одиночными $SiN_x$ нанопорами метод проведения электрохимических измерений может применяться и к другим микро- и нанофлюидным системам, в особенности к широкому спектру пористых материалов, в том числе к тонким пористым мембранам. С помощью разработанной экспериментальной установки, были исследованы характеристики ионного транспорта пористых мембран из анодного оксида алюминия ($Al_2O_3$ мембраны), а также $Al_2O_3$ мембран, покрытых слоем углерода ($C/Al_2O_3$ мембраны).

$Al_2O_3$ мембраны, изготавливаемые путем анодирования и селективного травления (методика подробно описана в работе [100]), подготавливались к экспериментам и исследовались согласно методам и протоколам описанным в главах 2.3, 2.4. Формирование углеродного проводящего слоя на поверхности $Al_2O_3$ мембран проводилось методом химического осаждения из газовой фазы без катализатора [28], в остальном процесс подготовки и измерения таких образцов ничем не отличался от обычных $Al_2O_3$ мембран.

В ходе экспериментов по исследованию ионного транспорта в пористых $Al_2O_3$ мембранах была проведена серия потенциостатических измерений в диапазоне прикладываемых напряжений от -500 мВ до +500 мВ с шагом 100 мВ, для концентраций электролита KCl от 0.01 мМ до 10 мМ. На основании потенциостатических измерений были построены ВАХ для каждой из используемых концентраций электролита. Типичная ВАХ $Al_2O_3$ пористой мембраны представлена на рисунке 38 – а. Линейная зависимость представленной характеристики говорит о симметричной форме наноканалов в мембране, а также о равномерном распределении поверхностного заряда в материале. Зависимость проводимости мембраны от концентрации электролита (см. рисунок 38 – б.) демонстрирует линейное поведение в диапазоне концентраций KCl 10мМ - 0.1 мМ, и небольшое отклонение от линейной зависимость в области 0.1 мМ - 0.01 мМ, которое может быть объяснено перекрытием ДЭС во внутреннем объеме массива наноканалов при низких концентрациях электролита. В целом, ВАХ $Al_2O_3$ мембран и одиночных $SiN_x$ нанопор (см. рисунок 26 – б.) качественно схожи между собой. Это объясняется схожими механизмами ионного транспорта как в массиве диэлектрических каналов $Al_2O_3$, так и во внутреннем объеме одиночной диэлектрической нанопоры.

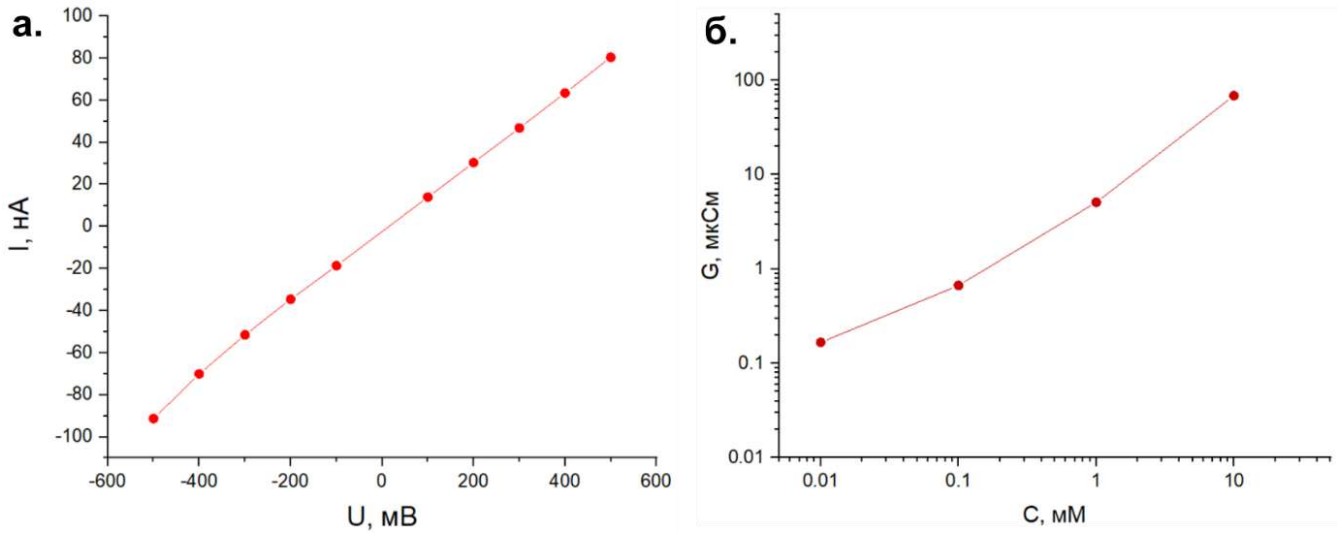


Рисунок 38 – а. Типичная ВАХ $Al_2O_3$ пористой мембраны при концентрации раствора KCl 0.01 мМ. б. Зависимость электрической проводимости $Al_2O_3$ пористой мембраны от концентрации электролита, полученная на основе ВАХ для различных концентраций KCl.

В $C/Al_2O_3$ мембранах, слой углерода на стенках наноканалов, может влиять на распределение ДЭС во время проведения электрохимических измерений. Влияние на ионный транспорт может также оказывать меньший диаметр наноканалов (по сравнению с немодифицированными $Al_2O_3$ мембранами), обусловленный осаждением слоя углерода. Совокупность малого диаметра наноканалов, при котором влияние ДЭС на проводимость мембраны носит более выраженный характер, а также наличие проводящего слоя на их стенках приводит к возникновению сложной зависимости величины ионного тока образца от прикладываемого к нему напряжения. Типичные ВАХ $C/Al_2O_3$ мембран, полученные для различных концентраций электролита, представлены на рисунке 39 – а,б. Из графиков видно, что при низких концентрациях электролита наблюдается наибольший эффект нелинейности ВАХ, влияние которого уменьшается по мере роста концентрации. Для раствора KCl 1 М, зависимость ионного тока от приложенного потенциала уже близка к линейной. Полученные экспериментальные данные указывают на то, что механизмы ионного транспорта в проводящих и диэлектрических наноканалах (порах) существенно отличаются друг

от друга. Для наглядной демонстрации влияния проводящего слоя углерода на механизмы ионного транспорта в наноканалах, на рисунке 39 – в. представлены нормированные ВАХ $Al_2O_3$ и $C/Al_2O_3$ мембран. Обнаруженный в результате проведения электрохимических измерений эффект влияния проводящего слоя углерода на характеристики ионного транспорта наноканалов, позволил провести исследование процессов поляризации поверхности проводящих массивов наноканалов $C/Al_2O_3$ мембран, подробно изложенное в работе [28].

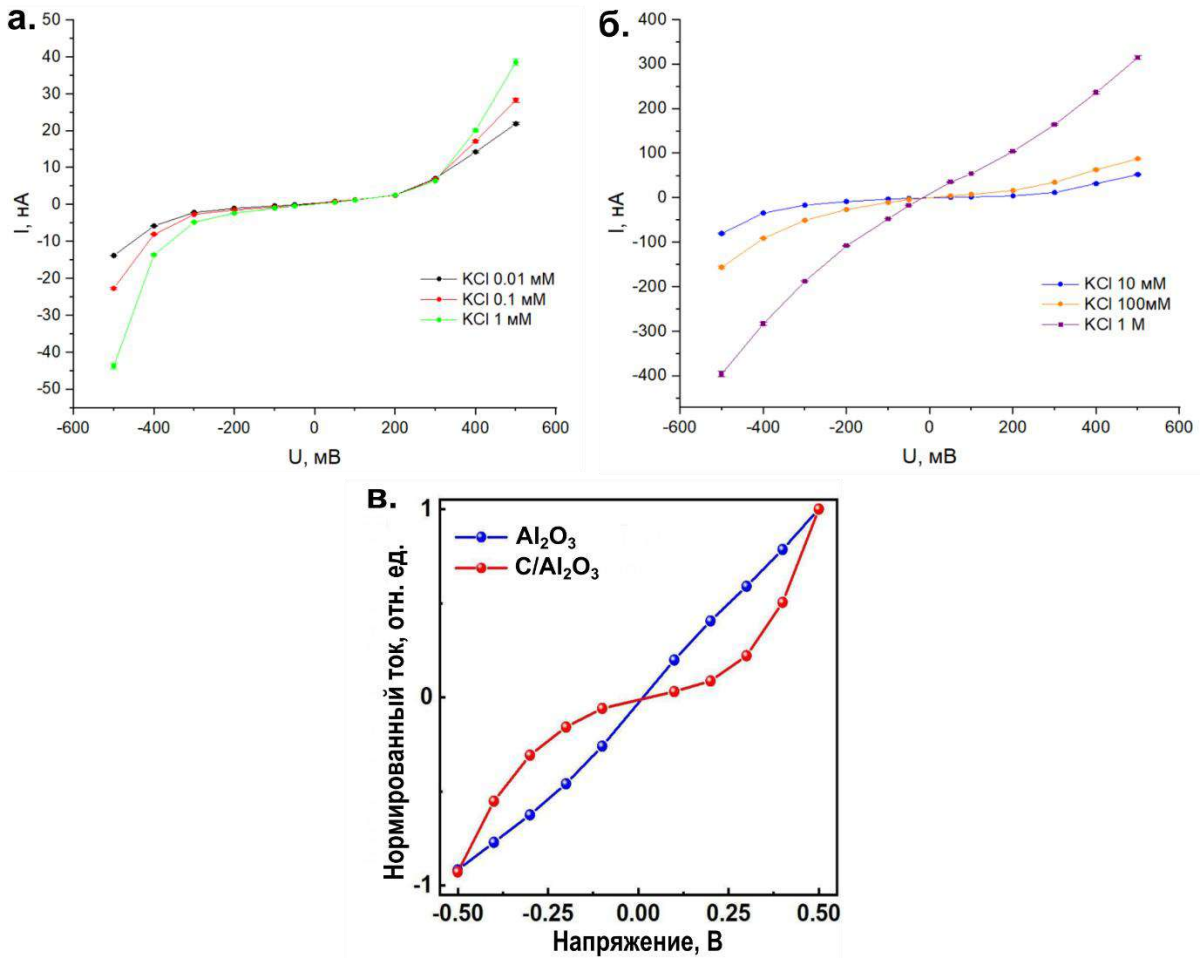


Рисунок 39 – а,б. ВАХ пористой $C/Al_2O_3$ мембраны при концентрациях раствора KCl 0.01 мМ – 1 М. в. Нормированные ВАХ пористых $Al_2O_3$ (синяя кривая) и $C/Al_2O_3$ (красная кривая) мембран.

В ходе проведенных работ было показано, что разработанная экспериментальная установка и развитый метод проведения электрохимических измерений, применимы для исследования механизмов транспорта в пористых

мембранах различной структуры. Возможности измерения ионного тока в диапазоне пА – мкА позволили исследовать характеристики $Al_2O_3$ мембран для концентраций электролита KCl 0.01 мМ – 10 мМ, а также характеристики $C/Al_2O_3$ мембран для концентраций KCl 0.01 мМ – 1 М. Благодаря проведенному комплексу экспериментов удалось сделать первоначальные выводы о влиянии проводящей поверхности на характеристики ионного транспорта в массивах наноканалов мембран. Таким образом была продемонстрирована возможность исследования механизмов ионного транспорта в диэлектрических и проводящих пористых мембранах, что может быть полезно для приложений, связанных с хранением энергии, фильтрацией жидкостей, а также детектированием биологических объектов в малых концентрациях.

## 3.8 Исследование методов детектирования и фиксации одиночных биологических молекул в твердотельных нанопорах

Следующим этапом работ стало изучение молекулярного транспорта белковых молекул в одиночных $SiN_x$ нанопорах. Под молекулярным нанопоровым транспортом подразумевается совокупность методов детектирования и анализа крупных молекулярных соединений (не ионов электролита, обладающих малыми размерами), чьи размеры сравнимы с диаметром нанопоры, Изучение молекулярного транспорта может включать в себя манипуляцию молекулами в области нанопоры, детектирование молекул, исследование физико-химические свойств детектируемых молекул, а также исследование динамики их взаимодействия с нанопорой. Поскольку исследования молекулярного транспорта представляют первостепенную важность для приложений детектирования и анализа одиночных биологических молекул, эксперименты проводились с биологическими молекулами различных размеров, свойств и функционала.

В ходе работ был разработан метод фиксации одиночных молекул в активной области $SiN_x$ нанопор под действием приложенного электрического поля. Данный метод был апробирован на одиночных белковых молекулах 20S протеасомы. Также

был проведен анализ возможного варианта реализации селективного транспорта белков в одиночных $SiN_x$ нанопорах.

**Разработка методики фиксации одиночных белковых молекул в области $SiN_x$ нанопоры**

Разработанный сенсор на основе одиночной $SiN_x$ нанопоры, ионный транспорт которого исследовался в прошлых разделах, обладает достаточной чувствительностью для исследования свойств одиночных биологических молекул. Особенный интерес представляет возможность исследования конформационной или функциональной активности белковых соединений в реальном времени. Однако метод одномолекулярного детектирования, основанный на транслокации молекул через пору, не походит для проведения данных исследований. Это обусловлено малой продолжительности процесса нахождения белков во внутреннем объеме нанопры в процессе транслокации. В данной работе была предложена другая методика нанопорового исследования одиночных биомолекул, суть которой заключается в фиксации одиночной молекулы в области нанопоры под действием приложенного электрического поля. Молекула транспортируется в область поры с помощью электрического поля и удерживается в этой области благодаря механизму стерической фильтрации, не позволяющему молекуле с диаметром $d_м$ пройти через нанопору диаметром d в случае $d_м > d$. Зафиксированная в области нанопоры молекула будет оказывать влияние на уровень измеряемого ионного тока, причем продолжительность этого влияния будет совпадать с продолжительностью процесса фиксации, теоретически не ограниченного во времени. Таким образом, процесс фиксации молекулы должен сопровождаться скачкообразным изменением уровня нанопорового ионного тока, продолжительность которого будет совпадать с продолжительностью фиксации. Амплитуда изменения тока при фиксации молекулы будет определяться степенью перекрытия зафиксированной молекулой внутреннего объема нанопоры. Изменение конформационных, структурных или иных свойств зафиксированной молекулы должно влиять на степень перекрытия поры и, следовательно, приводить

к изменению уровня ионного тока. Влияние свойств зафиксированной молекулы на уровень ионного тока открывает возможности по регистрации функциональной динамики биологических соединений в реальном времени, что особенно полезно в исследованиях активности одиночных белковых молекул. Исходя из этого, данный этап работ был посвящен разработке метода фиксации одиночных молекул в области $SiN_x$ нанопоры.

Первоначально, методика фиксации была опробована на белковых молекулах (ферментах) пероксидазы хрена (Horseradish peroxidase – HRP), молекулярная масса ~ 40 кДа [101]. Данный белок был выбран благодаря хорошо известным физико-химическим свойствам, а также участию в каталитических реакциях окисления в присутствии субстрата 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевой соли (ABTS) и перекиси водорода ($H_2O_2$) [102]. Таким образом, при фиксации в нанопоре молекулы HRP и последующем добавлении субстрата ABTS и перекиси водорода, начавшаяся реакция окисления должна дать возможность регистрации изменений структурных свойств зафиксированной молекулы. Для эксперимента была выбрана одиночная $SiN_x$ нанопора d ~ 6.8 нм (вставка на рисунке 40), чей размер подходит для фиксации молекулы HRP. В качестве буферного раствора использовался PBS-D буфер в концентрации 2 мМ, pH = 7.4. Молекулы HRP в концентрации 10 нМ добавлялись в cis- объем ячейки во время проведения потенциостатического измерения (U = -200 мВ, $I_0$ ~ 115 пА). В используемом буферном растворе, HRP обладает отрицательным поверхностным зарядом и электрофоретически движется в сторону поры при приложении электрического поля необходимой полярности. После переключения полярности напряжения на +200 мВ и обратно на -200 мВ (участки 2,3 на рисунке 40), наблюдается снижение уровня тока до I ~ 50 пА. Это снижение уровня тока связано с процессом фиксации молекулы HRP в области нанопоры. После добавления в ячейку ABTS и $H_2O_2$ (участки 4,5 на рисунке 40), на отрезке с 1000 по 2500 с наблюдалась серия значительных колебаний уровня ионного тока, предположительно связанная с ферментативной активностью молекулы HRP. Подробности эксперимента и дополнительные исследования описаны в работе

[103]. Данная работа, в свою очередь, фокусируется на разработке метода фиксации одиночных молекул, успешно реализованного при фиксации молекулы HRP в области $SiN_x$ нанопоры.

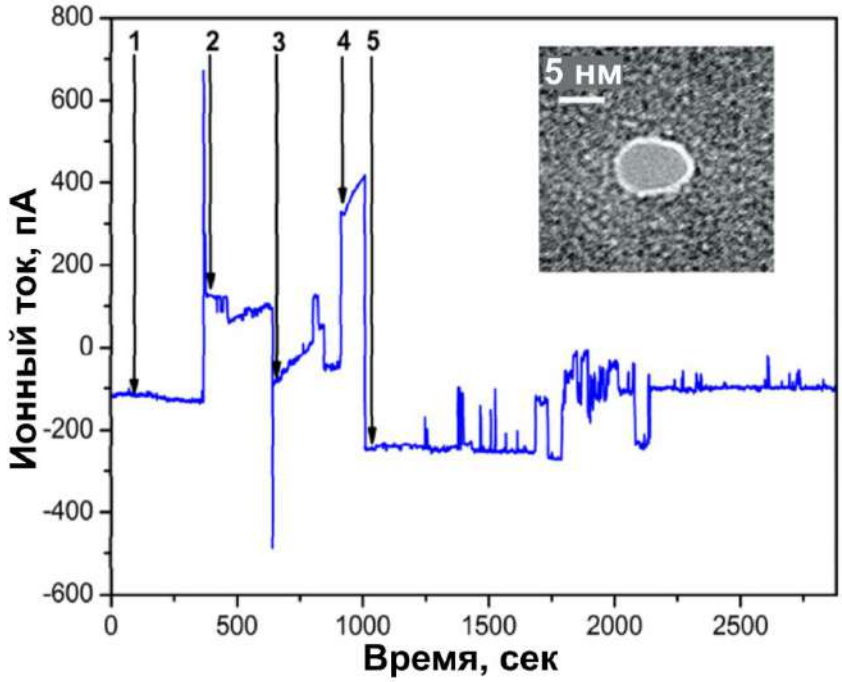


Рисунок 40 – Зависимость ионного тока от времени одиночной $SiN_x$ нанопоры d ~ 6.8 нм при проведении эксперимента по фиксации одиночной молекулы HRP, вставка демонстрирует ПЭМ изображение использованной нанопоры.

1. Добавление молекул HRP, U = −200 мВ.

2. Напряжение измененно на U = +200 мВ. 3. Напряжение изменено на U = −200 мВ. 4. Добавление 0,3 мМ ABTS. 5. Добавление $H_2O_2$.

Работы с молекулами HRP экспериментально показали возможность реализации метода фиксации одиночных белковых молекул. Однако используемый электролит низкой концентрации и небольшой диаметр нанопоры, обусловленный малыми размерами молекул HRP, обеспечили низкое отношение сигнал/шум измеряемого электрического сигнала.

Для улучшения чувствительности экспериментов, метод фиксации молекул необходимо развивать на примере крупных, стабильных белковых соединений, обеспечивающих возможность использования пор большого диаметра и высоких концентраций. Хорошим вариантом на роль таких молекул стали белковые 20S-

частицы протеасом, представляющих собой крупные цилиндрические молекулы длиной 15 нм и диаметром 11.5 нм (см. рисунок 41 – а.) [104]. Молекулы 20S-частиц протеасом обладают молекулярной массой ~ 700 кДа, отрицательным поверхностным зарядом при нейтральных pH и характеризуются значительными конформационными изменениями своей структуры в процессе протеолиза малых белков.

В ходе проведения эксперимента по фиксации одиночных молекул 20S-протеасомы (метод подробно описан в разделе 2.4) были измерены величины ионного тока через нанопору (d ~ 8.9 нм, см. рисунок 41 – б.) в чистом буферном растворе, и в буферном растворе после добавления исследуемых молекул. Схема фиксации одиночной молекулы 20S протеасомы в области $SiN_x$ мембраны представлена на рисунке 41 – в.

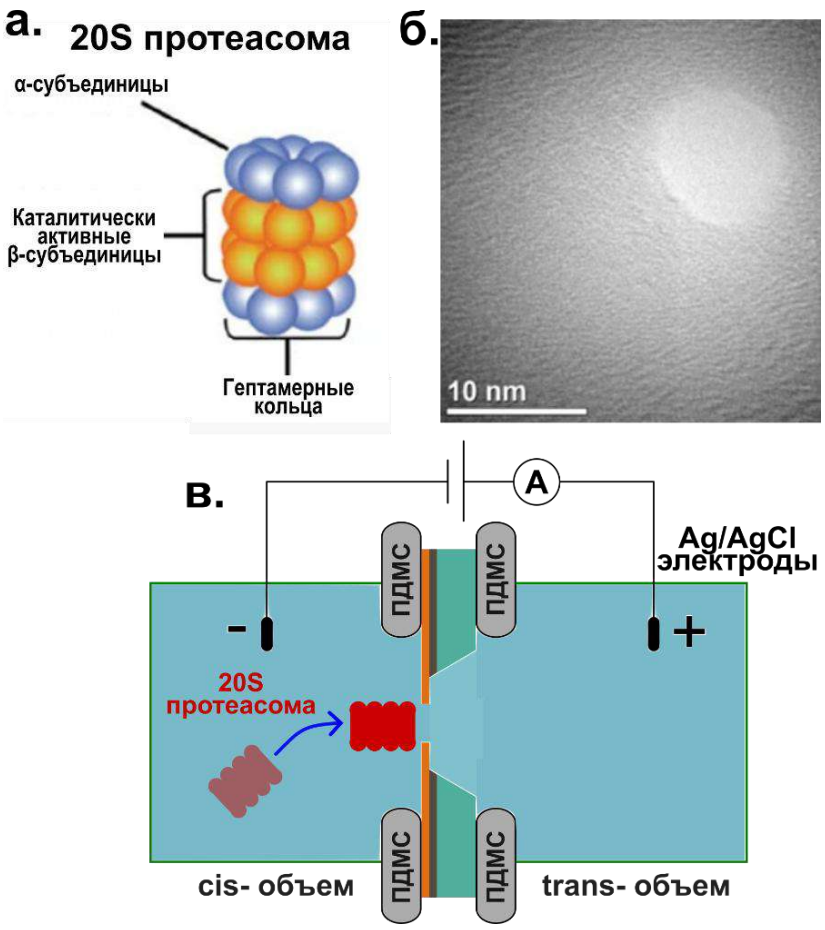


Рисунок 41 – а. Изображение молекулы 20S протеасомы с обозначенными структурными субъединицами. б. ПЭМ изображение одной из $SiN_x$ нанопор,

использовавшихся в экспериментах по фиксации 20S протеасом. в. Схема фиксации одиночной молекулы 20S протеасомы в области $SiN_x$ нанопоры под действием приложенного электрического поля.

На токовой кривой чистого буферного раствора (см. рисунок 42, красная кривая) отсутствуют скачкообразные изменения уровня тока, которые можно было бы интерпретировать как сигналы блокировки поры и/или прохождения через нее молекул большого размера. Значение ионного тока составило 4,5 нА (U = 300 мВ). После добавления в cis- объем ячейки молекул 20S-протеасом в концентрации 5 нМ, отрицательно заряженные молекулы перемещаются в область поры под действием приложенного электрического поля. Поскольку размеры нанопоры (8-10 нм) не позволяют молекулам 20S-протеасом проходить через ее внутренний объем, ожидается, что одна из молекул будет зафиксирована в области поры. После добавления молекул протеасом в объем измерительной ячейки, ионный тока через нанопору снизился на 20% и составил 3,6 нА (синяя кривая на рисунке 42). Более того, на полученной токовой кривой наблюдаются резкие скачкообразные изменения уровня ионного тока, которые можно связать с движениями зафиксированной молекулы в области поры.

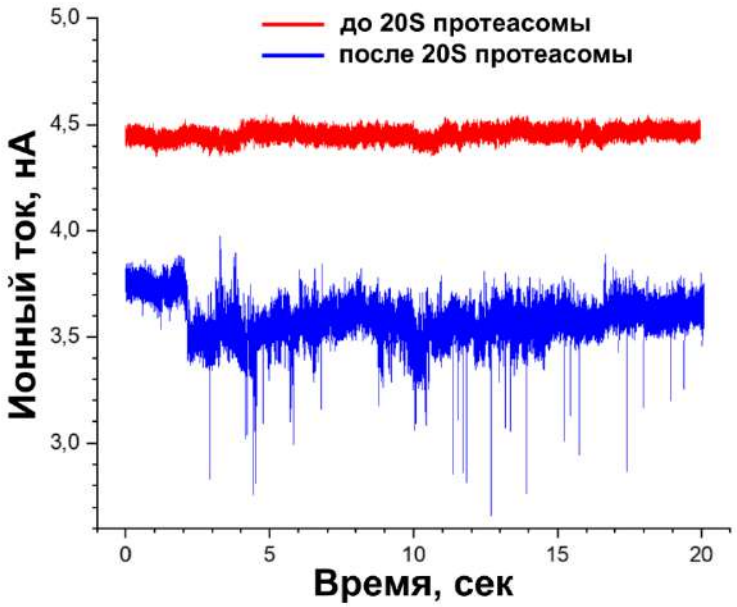


Рисунок 42 – Зависимости нанопорового ионного тока от времени до добавления в измерительную ячейку молекул 20S протеасом (красная кривая) и после (синяя кривая).

Таким образом, в ходе эксперимента предположительно была реализована фиксация одиночной частицы 20S-протеасомы в области поры, что вызвало изменения в уровне регистрируемого ионного тока.

Далее для более детального изучения механизма фиксации молекул, был проведен комплекс работ по исследованию транспортных свойств молекул 20S-протеасом. В экспериментах использовались нанопоры диаметром 8-10 нм и длиной ~ 30 нм. На рисунке 43 – а,б. показаны типичные токовые кривые до и после добавления в ячейку молекул 20S-протеасом, при прямой (+300 мВ) и обратной (-300 мВ) полярности напряжения.

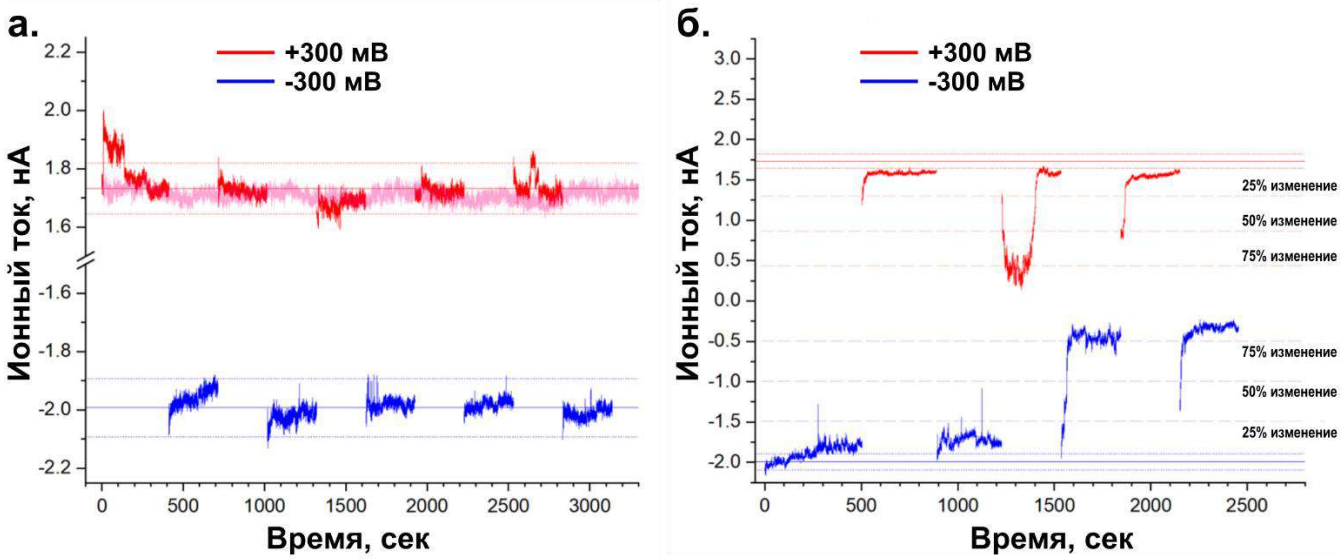


Рисунок 43 – а. Исследование стабильности нанопорового ионного тока до добавления в измерительную ячейку молекул 20S протеасом, при прямой и обратной полярности напряжения. б. Демонстрация нескольких последовательных событиях фиксации молекул 20S протеасомы в области $SiN_x$ нанопоры.

Измерения в чистом буферном растворе, до добавления протеасом, демонстрируют высокую стабильность уровня ионного тока, практически не выходящего за пределы ± 5% от $I_{средн}$ (пунктирные линии на рисунке 43 – а.) при прямой и обратной полярности напряжений. Высокая стабильности уровня ионного тока указывает на отсутствие в буферном растворе паразитных молекул способных взаимодействовать с нанопорой. Исходя из этого, амплитуда изменения ионного тока, при которой сигнал будет относиться с процессом фиксации 20S протеасом в области поры, была выбрана как $\Delta I > 25\%$ от уровня $I_{средн}$. После добавления в ячейку молекул 20S протеасом, на токовых кривых начинали появляться сигналы фиксации молекул. Последовательность из нескольких последовательных сигналов фиксации представлена на рисунке 43 – б. Данные от нескольких проведенных экспериментов демонстрируют что основная часть событий фиксации происходит при обратной полярности напряжения (рисунок 44). Это означает фиксацию молекул в поре против направления электрофореза.

Данный эффект предположительно может быть связан с захватом молекул электроосмотическим потоком, поскольку в исследуемой нанопоровой системе, электрофорез и электроосмос направлены в противоположные стороны за счет отрицательного поверхностного заряда как молекул 20S протеасом, так и стенок $SiN_x$ нанопоры.

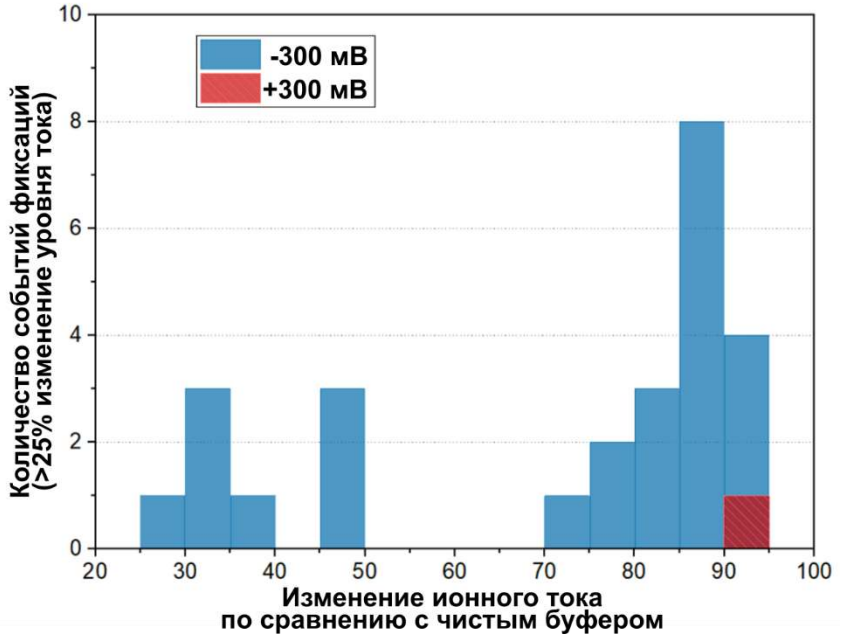


Рисунок 44 – Распределение событий фиксации молекул 20S протеасомы в области $SiN_x$ нанопоры в зависимости от величины изменения ионного тока и полярности прикладываемого напряжения.

Основная часть зарегистрированных событий фиксации характеризуется изменением величины ионного тока в диапазоне 70-95%. Однако, существуют события с относительно небольшой амплитудой изменения тока 25-50%. Широкий разброс амплитуды событий фиксаций может объясняться различной степенью перекрытия внутреннего объема поры молекулами 20S-протеасомы.

Таким образом в ходе выполнения работы был разработан метод фиксации одиночных белковых молекул в области $SiN_x$ нанопоры под действием приложенного электрического поля. Дальнейшее развитие данного метода может позволить проводить исследования функциональной динамики биологических молекул в реальном времени, без необходимости их предварительной модификации.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертации получены следующие основные результаты:

1. Отработана методика изготовления свободноподвешенных мембран из аморфных пленок $SiN_x$ толщиной 25 -200 нм с использованием методов оптической и электронной литографии в сочетании с методами жидкостного анизотропного и плазмохимического травления. Отработана методика формирования Au плазмонных антенн-бабочек на поверхности $SiN_x$ мембран, а также одиночных нанопор заданного диаметра с помощью травления сфокусированным электронным лучом. Численное моделирование характеристик плазмонных антенн и одномерное расчетное приближение характеристик одиночных нанопор хорошо коррелируют с экспериментальными результатами;

2. Исследовано влияние сфокусированного лазерного излучения $\lambda$ = 632 нм и мощностью $P_{опт}$ = 10 КВт/см$^2$ на нанопоровый ионный транспорт. Воздействие лазерного излучения приводит к увеличению удельной проводимости одиночной $SiN_x$ нанопоры на 6% и одиночной $SiN_x$ нанопоры с плазмонной Au антенной на 10% в растворе KCl;

3. Исследован метод управления управления ионным KCl транспортом в одиночных $SiN_x$ нанопорах с плазмонными Au антеннами при помощи широкополосного $\lambda$ = 400-1000 нм излучения низкой интенсивности $P_{опт}$ = 35 мВт/см$^2$, позволяющий увеличить удельную проводимость поры на 35%;

4. Определен диапазон применимости метода управления нанопоровым ионным транспортом при помощи широкополосного оптического излучения путем исследования влияния спектрального состава излучения на эффект увеличения удельной проводимости одиночных $SiN_x$ нанопор, а также путем исследования эффектов объемного нагрева электролита и локального нагрева области нанопоры;

5. Исследован способ фиксации одиночных молекул белков в области одиночной $SiN_x$ нанопоры для возможности дальнейшего изучения функциональной активности белков в реальном времени с помощью твердотельного нанопорового биосенсора.

6. Апробирован способ фиксации одиночных молекул белков 20S-частиц протеасомы длиной 15 нм и диаметром 11,5 нм в области одиночной $SiN_x$ нанопоры под действием приложенного электрического поля.

**По результатам работы опубликованы следующие статьи:**

1. 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, № 14. P. 16172–16181.

2. **Vaulin, N. V.**, Afonicheva, P. K., Lebedev, D. V., Bukatin, A. S., Mukhin, I. S. Study of ion transport in single solid state nanopores formed by optical and ion lithography // St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics, 2023. №1. P. 385.

3. **Ваулин Н.В**., Афоничева П.К., Лебедев Д.В., Букатин А.С., Мухин И.С., Евстрапов А.А. Исследование фотоиндуцированных процессов в единичных твердотельных нанопорах с интегрированными плазмонными структурами // Физика твердого тела, 2023. Т. 65, № 12. С. 2201–2204.

4. **Ваулин Н.В**., Афоничева П.К., Лебедев Д.В., Букатин А.С., Мухин И.С., Евстарпов А.А. Детектирование единичных биомолекул с помощью твердотельного нанопорового SiN/Si-сенсора // Физика и техника полупроводников, 2024. Т. 58, № 9. С. 471-473.

5. Афоничева П.К., **Ваулин Н.В**., Лебедев Д.В., Букатин А.С., Мухин И.С., Евстрапов А.А. Влияние оптического излучения различной длины волны на транспортные характеристики тонких SiN-мембран с интегрированными единичными нанопорами // Письма в Журнал технической физики, 2023. Т. 49, № 23. С. 35-37.

6. Kharchenko I.A., **Vaulin N.V**., Simunin M.M., Mareev S.A., Nemtsev I.V., Goltaev A.S., Lebedev D.V., Ryzhkov I.I. Enhancement of ionic conductivity in electrically conductive membranes by polarization effect // Electrochimica Acta, 2024. Vol. 506. P. 144994.

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

детектирование одиночных молекул ДНК с помощью твердотельной нанопоры // Научное приборостроение, 2024. Т. 34, № 4. С. 34-42.

8. Afonicheva, P. K., **Vaulin, N. V**., Lebedev, D. V., Bukatin, A. S., Mukhin, I. S., Evstrapov, A. A. Investigation of ion transport in solid-state nanopores upon optical radiation. // St. Petersburg Polytechnic University Journal: Physics and Mathematics, 2023. Vol. 63, № 1.1. P. 389–392.

9. Ivanov YU.D., Vinogradova A.V., Nevedrova E.D., Ableev A.N., Kozlov A.F., Shumov I.D., Ziborov V.S. Afonin O.N., **Vaulin N.V**., Lebedev D.V., Bukatin A.S., Afonicheva P.K., Mukhin I.S., Usanov S.A., Archakov A.I. Solid-State Nanopore-Based Nanosystem for Registration of Enzymatic Activity of a Single Molecule of Cytochrome P450 BM3 // International Journal of Molecular Sciences, 2024. Vol 25, № 19. P. 10864.

10. Ivanov YU.D., Ableev A.N., Shumov I.D., Ivanova I.A., **Vaulin N.V**., Lebedev D.V., Bukatin A.S., Mukhin I.S., Archakov A.I. Registration of Functioning of a Single Horseradish Peroxidase Macromolecule with a Solid-State Nanopore // International Journal of Molecular Sciences, Vol. 24, № 21. P. 15636.

11. Иванов Ю.Д., Аблеев А.Н., Шумянцева В.В., Жданов Д.Д., Покровская М.В., Александрова С.С., Иванова И.А., Виноградова А.В., Неведрова Е.Д., Зиборов В.С., **Ваулин Н.В**., Лебедев Д.В., Букатин А.С., Мухин И.С., Арчаков А.И. Регистрация активности единичных молекул аспарагиназы с помощью нанопорового детектора // Вестник Государственного университета просвещения. Серия: Физика-Математика, 2024. № 1. С. 20-32.

**Благодарности**

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю к.ф.-м.н. Лебедеву Денису Владимировичу, коллективу лаборатории ВИЭ, в особенности д.ф.-м.н. Мухину Ивану Сергеевичу, к.ф.-м.н. Букатину Антону Сергеевичу, а также д.т.н. Евстрапову Анатолию Александровичу за профессиональные, своевременные наставления и рекомендации в процессе подготовки и написания диссертации. Отдельную благодарность хочу выразить Афоничевой Полине Константиновне за всестороннюю поддержку, Васильевой Татьяне Александровне и Виноградову Алексею Юрьевичу за то, что были рядом. Также хочу сказать спасибо своей семье, которая всегда была для меня опорой.

Без всех вас этой работы бы не было.

# ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АСМ – атомно-силовой микроскоп;

ВАХ – вольт-амперная характеристика;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДЭС – двойной электрический слой;

ИВТ – ионное выпрямление тока;

КР – комбинационное рассеяние;

Крио-ЭМ – электронная криомикроскопия;

МД – молекулярная динамика;

ПВХ – поливинилхлорид;

ПДМС – полидиметилсилоксан;

ПЭМ – просвечивающий электронный микроскоп;

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп;

COF – ковалентный органический каркас;

MOF – металл-органический каркас;

Point-of-care – тестирование в месте оказание помощи;

SERS – спектроскопия усиленного поверхностного Рамановского рассеяния.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Gooding J.J., Gaus K. Single-molecule sensors: challenges and opportunities for quantitative analysis // Angewandte Chemie, 2016. Vol. 128, № 38. P. 11526–11539.

2. Welch E.C. et al. Advances in biosensors and diagnostic technologies using nanostructures and nanomaterials // Advanced Functional Materials, 2021. Vol. 31, № 44. P. 2104126.

3. Mardis E.R. DNA sequencing technologies: 2006-2016 // Nature Protocols, 2017. Vol. 12, № 2. P. 213–218.

4. Nayak S. et al. Point-of-care diagnostics: recent developments in a connected age // Analytical Chemistry, 2017. Vol. 89, № 1. P. 102–123.

5. Itoh T. et al. Toward a new era of SERS and TERS at the nanometer scale: From fundamentals to innovative applications // Chemical Reviews, 2023. Vol. 123, № 4. P. 1552–1634.

6. Ataide V.N. et al. Electrochemical paper-based analytical devices: Ten years of development // Analytical Methods, 2020. Vol. 12, № 8. P. 1030–1054.

7. Katsanis S.H., Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics // Nature Reviews Genetics, 2013. Vol. 14, № 6. P. 415–426.

8. Naresh V., Lee N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors // Sensors, 2021. Vol. 21, № 4. P. 1–35.

9. Manzari M.T. et al. Targeted drug delivery strategies for precision medicines // Nature Reviews Materials, 2021. Vol. 6, № 4. P. 351–370.

10. Yang S.M. et al. Microfluidic Point-of-Care (POC) Devices in early diagnosis: A review of opportunities and challenges // Sensors, 2022. Vol. 22, № 4. P. 1620.

11. Brinkman W.F., Haggan D.E., Troutman W.W. A History of the invention of the transistor and where it will lead us // IEEE journal of solid-state circuits, 1997. Vol. 32, № 12. P. 1858-1865.

12. Hurley J. Sizing Particles with a Coulter Counter // Biophysical journal, 1970. Vol. 10, № 1. P. 74–79.

13. Manz A. et al. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems Capillary electrophoresis on a chip // Journal of Chromatography A, 1992. Vol. 593, № 1–2. P. 253–258.

14. Whitesides G.M. The origins and the future of microfluidics // Nature, 2006. Vol. 442, № 7101. P. 368–373.

15. Binnig G., Quate C. F., Gerber C. Atomic force microscope // Physical review letters, 1986. Vol. 56, № 9. P. 930.

16. Drake B. et al. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope // Science, 1989. Vol. 243, № 4898. P. 1586–1589.

17. Deamer D., Akeson M., Branton D. Three decades of nanopore sequencing // Nature Biotechnology, 2016. Vol. 34, № 5. P. 518–524.

18. Sheng Z. et al. Liquid-based porous membranes // Chemical Society Reviews, 2020. Vol. 49, № 22. P. 7907–7928.

19. Thomas R. C. Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells // Physiological reviews, 1972. Vol. 52, № 3. P. 563–594.

20. Kasianowicz J.J. et al. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel // Biophysics, 1996. Vol. 93. P. 13770–13773.

21. Schneider G.F., Dekker C. DNA sequencing with nanopores // Nature Biotechnology, 2012. Vol. 30, № 4. P. 326–328.

22. Li J. et al. Ion-beam sculpting at nanometre length scales // Nature, 2001. Vol. 412, № 6843. P. 166–169.

23. Crnković A., Srnko M., Anderluh G. Biological nanopores: Engineering on demand // Life, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–30.

24. Liang L. et al. Overview of the materials design and sensing strategies of nanopore devices // Coordination Chemistry Reviews, 2023. Vol. 478. P. 214998.

25. Merchant C. DNA translocation through graphene nanopores // Biophysical Journal, 2011. Vol. 100, № 3. P. 521a.

26. Kowalczyk S.W. et al. Modeling the conductance and DNA blockade of solid-state nanopores // Nanotechnology, 2011. Vol. 22, № 31. P. 315101.

27. Vodyanoy I., Bezrukov S.M. Sizing of an ion pore by access resistance measurements // Biophysical journal, 1992. Vol. 62, № 1. P. 10.

28. Kharchenko I.A. et al. Enhancement of ionic conductivity in electrically conductive membranes by polarization effect // Electrochimica Acta, 2024. Vol. 506. P. 144994.

29. Guo W., Tian Y., Jiang L. Asymmetric ion transport through ion-channel-mimetic solid-state nanopores // Accounts of chemical research, 2013. Vol. 46, № 12. P. 2834–2846.

30. Duleba D., Johnson R.P. Sensing with ion current rectifying solid-state nanopores // Current Opinion in Electrochemistry, 2022. Vol. 34. P. 100989.

31. Siwy Z. et al. Conical-nanotube ion-current rectifiers: the role of surface charge // Journal of the American Chemical Society, 2004. Vol. 126, № 35. P. 10850–10851.

32. Chinappi M. et al. Analytical model for particle capture in nanopores elucidates competition among electrophoresis, electroosmosis, and dielectrophoresis // ACS Nano, 2020. Vol. 14, № 11. P. 15816–15828.

33. Van Meervelt V. et al. Real-time conformational changes and controlled orientation of native proteins inside a protein nanoreactor // Journal of the American Chemical Society, 2017. Vol. 139, № 51. P. 18640–18646.

34. Gadaleta A. et al. Ultra-sensitive flow measurement in individual nanopores through pressure - Driven particle translocation // Nanoscale, 2015. Vol. 7, № 17. P. 7965–7970.

35. Asandei A. et al. Electroosmotic trap against the electrophoretic force near a protein nanopore reveals peptide dynamics during capture and translocation // ACS applied materials & interfaces, 2016. Vol. 8, № 20. P. 13166–13179.

36. He Y. et al. Thermophoretic manipulation of DNA translocation through nanopores // ACS Nano, 2013. Vol. 7, № 1. P. 538–546.

37. Jonsson M.P., Dekker C. Plasmonic nanopore for electrical profiling of optical intensity landscapes // Nano letters, 2013. Vol. 13, № 3. P. 1029–1033.

38. Shi X. et al. Integrating Sub-3 nm Plasmonic Gaps into Solid-State Nanopores // Small, 2018. Vol. 14, № 18. P. 1703307.

39. Guo W. et al. Energy harvesting with single-ion-selective nanopores: A concentration-gradient-driven nanofluidic power source // Advanced functional materials, 2010. Vol. 20, № 8. P. 1339–1344.

40. Cao L. et al. Concentration-gradient-dependent ion current rectification in charged conical nanopores // Langmuir, 2012. Vol. 28, № 4. P. 2194–2199.

41. Lin C.Y. et al. Modulation of charge density and charge polarity of nanopore wall by salt gradient and voltage // ACS Nano, 2019. Vol. 13, № 9. P. 9868–9879.

42. Saharia J., Bandara Y.M.N.D.Y., Kim M.J. Investigating protein translocation in the presence of an electrolyte concentration gradient across a solid-state nanopore // Electrophoresis, 2022. Vol. 43, № 5–6. P. 785–792.

43. Muthukumar M. Mechanism of DNA transport through pores // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 2007. Vol. 36, № 1. P. 435–450.

44. Xing X.L. et al. Single Molecule DNA Analysis Based on Atomic-Controllable Nanopores in Covalent Organic Frameworks // Nano Letters, 2022. Vol. 22, № 3. P. 1358–1365.

45. Firnkes M. et al. Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: Conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis // Nano letters, 2010. Vol. 10, № 6. P. 2162–2167.

46. Smeets R.M.M. et al. Salt dependence of ion transport and DNA translocation through solid-state nanopores // Nano letters, 2006. Vol. 6, № 1. P. 89–95.

47. Akhtarian S. et al. Nanopore sensors for viral particle quantification: current progress and future prospects // Bioengineered, 2021. Vol. 12, № 2. P. 9189–9215.

48. Verschueren D. V. et al. Label-free optical detection of DNA translocations through plasmonic nanopores // ACS nano, 2018. Vol. 13, № 1. P. 61–70.

49. Chae H. et al. Solid-state nanopore analysis on conformation change of p53TAD-MDM2 fusion protein induced by protein-protein interaction // Nanoscale, 2018. Vol. 10, № 36. P. 17227–17235.

50. Xi G. et al. Discriminating Single Nucleotide Variations in Solid-State Nanopores by Evaluating the Combination Efficiency between DNA Polymerase and Its Substrate // The Journal of Physical Chemistry B, 2023. Vol. 127, № 21. P. 4790–4799.

51. Wang Z. et al. Metal–Organic Cage as Single-Molecule Carrier for Solid-State Nanopore Analysis // Small Methods, 2022. Vol. 6, № 11. P. 2200743.

52. Tong X. et al. Probing conformational change of T7 RNA polymerase and DNA complex by solid-state nanopores // Chinese Physics B, 2018. Vol. 27, № 11. P. 118705.

53. Liu S.C. et al. Snapshotting the transient conformations and tracing the multiple pathways of single peptide folding using a solid-state nanopore // Chemical Science, 2021. Vol. 12, № 9. P. 3282–3289.

54. Cao C. et al. Discrimination of oligonucleotides of different lengths with a wild-type aerolysin nanopore // Nature nanotechnology, 2016. Vol. 11, № 8. P. 713–718.

55. Confederat S. et al. Next-generation nanopore sensors based on conductive pulse sensing for enhanced detection of nanoparticles // Small, 2024. Vol. 20, № 4. P. 2305186.

56. Xue L. et al. Solid-state nanopore sensors // Nature Reviews Materials. Nature Research, 2020. Vol. 5, № 12. P. 931–951.

57. Wanunu M. et al. Rapid electronic detection of probe-specific microRNAs using thin nanopore sensors // Nature nanotechnology, 2010. Vol. 5, № 11. P. 807–814.

58. Gilboa T. et al. Single-molecule DNA methylation quantification using electro-optical sensing in solid-state nanopores // ACS mano, 2016. Vol. 10, № 9. P. 8861–8870.

59. Wang R. et al. Single-molecule discrimination of labeled DNAs and polypeptides using photoluminescent-free TiO2 nanopores // ACS nano, 2018. Vol. 12, № 11. P. 11648–11656.

60. Li S. et al. Dynamics of DNA clogging in hafnium oxide nanopores // The Journal of Physical Chemistry B, 2020. Vol. 124, № 51. P. 11573–11583.

61. Verschueren D., Shi X., Dekker C. Nano-Optical Tweezing of Single Proteins in Plasmonic Nanopores // Small Methods, 2019. Vol. 3, № 5. P. 1800465.

62. Venkatesan B.M. et al. DNA sensing using nanocrystalline surface-enhanced Al2O3 nanopore sensors // Advanced functional materials, 2010. Vol. 20, № 8. P. 1266–1275.

63. Lu J. et al. Light-regulated nanofluidic ionic diodes with heterogeneous channels stemming from asymmetric growth of metal-organic frameworks // Analytical Chemistry, 2022. Vol. 94, № 10. P. 4328–4334.

64. Gu C. et al. Experimental study of protein translocation through MoS2 nanopores // Applied Physics Letters, 2019. Vol. 115, № 22.

65. Mojtabavi M. et al. Single-molecule sensing using nanopores in two-dimensional transition metal carbide (MXene) membranes // ACS nano, 2019. Vol. 13, № 3. P. 3042–3053.

66. Heerema S.J. et al. Probing DNA translocations with inplane current signals in a graphene nanoribbon with a nanopore // ACS nano, 2018. Vol. 12, № 3. P. 2623–2633.

67. Awasthi S. et al. Polymer coatings to minimize protein adsorption in solid-state nanopores // Small Methods, 2020. Vol. 4, № 11. P. 2000177.

68. Schneider G.F. et al. DNA translocation through graphene nanopores // Nano letters, 2010. Vol. 10, № 8. P. 3163–3167.

69. Chen Q. et al. Fabrication of nanopores and nanoslits with feature sizes down to 5 nm by wet etching method // Nanotechnology, 2018. Vol. 29, № 8. P. 085301.

70. Kwok H., Briggs K., Tabard-Cossa V. Nanopore fabrication by controlled dielectric breakdown // PloS One, 2014. Vol. 9, № 3. P. e92880.

71. Gilboa T. et al. Automated, ultra-fast laser-drilling of nanometer scale pores and nanopore arrays in aqueous solutions // Advanced Functional Materials, 2020. Vol. 30, № 18. P. 1900642.

72. Chou Y.C. et al. Lifetime and stability of silicon nitride nanopores and nanopore arrays for ionic measurements // ACS nano, 2020. Vol. 14, № 6. P. 6715–6728.

73. Zhu X. et al. Monolithic integration of vertical thin-film transistors in nanopores for charge sensing of single biomolecules // ACS nano, 2021. Vol. 15, № 6. P. 9882–9889.

74. Yang H. et al. Identification of single nucleotides by a tiny charged solid-state nanopore // Journal of Physical Chemistry B, 2018. Vol. 122, № 32. P. 7929–7935.

75. Fu J. et al. Solid-state nanopore analysis on the conformation change of DNA polymerase I induced by a DNA substrate // Analyst, 2022. Vol. 147, № 13. P. 3087–3095.

76. Luo Y. et al. Application of solid-state nanopore in protein detection // International journal of molecular sciences, 2020. Vol. 21, № 8. P. 2808.

77. Jeong K.B. et al. Reduction of DNA Folding by Ionic Liquids and Its Effects on the Analysis of DNA–Protein Interaction Using Solid-State Nanopore // Small, 2018. Vol. 14, № 31. P. 1801375.

78. Sethi K. et al. Direct detection of conserved viral sequences and other nucleic acid motifs with solid-state nanopores // ACS nano, 2021. Vol. 15, № 5. P. 8474–8483.

79. Laucirica G. et al. Biomimetic solid-state nanochannels for chemical and biological sensing applications // TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021. Vol. 144. P. 116425.

80. Acar E. T. et al. Biomimetic potassium-selective nanopores //Science advances, 2019. Vol. 5, № 2. P. eaav2568.

81. Graf M. et al. Light-enhanced blue energy generation using MoS2 nanopores // Joule, 2019. Vol. 3, № 6. P. 1549–1564.

82. Cao L. et al. On the origin of ion selectivity in ultrathin nanopores: insights for membrane-scale osmotic energy conversion // Advanced Functional Materials, 2018. Vol. 28, № 39. P. 1804189.

83. Vlassiouk I., Siwy Z.S. Nanofluidic diode // Nano letters, 2007. Vol. 7, № 3. P. 552–556.

84. Cheng L.J., Guo L.J. Nanofluidic diodes // Chemical Society Reviews, 2010. Vol. 39, № 3. P. 923–938.

85. Duan L., Yobas L. Label-free multiplexed electrical detection of cancer markers on a microchip featuring an integrated fluidic diode nanopore array // ACS nano, 2018. Vol. 12, № 8. P. 7892–7900.

86. Tsutsui M. et al. Solid-state nanopore time-of-flight mass spectrometer // ACS sensors, 2019. Vol. 4, № 11. P. 2974–2979.

87. Shi X., Verschueren D. V., Dekker C. Active delivery of single DNA molecules into a plasmonic nanopore for label-free optical sensing // Nano letters, 2018. Vol. 18, № 12. P. 8003–8010.

88. Nicoli F. et al. DNA translocations through solid-state plasmonic nanopores // Nano letters, 2014. Vol. 14, № 12. P. 6917–6925.

89. Garoli D. et al. Plasmonic nanopores for single-molecule detection and manipulation: toward sequencing applications // Nano letters, 2019. Vol. 19, № 11. P. 7553–7562.

90. Lu W. et al. Electro-Optical Detection of Single Molecules Based on Solid-State Nanopores // Small Structures, 2020. Vol. 1, № 1. P. 2000003.

91. Ciarlo D.R. Silicon nitride thin windows for biomedical microdevices // Biomedical Microdevices, 2002. Vol. 4. P. 63–68.

92. Zograf G.P. et al. Resonant nonplasmonic nanoparticles for efficient temperature-feedback optical heating // Nano letters, 2017. Vol. 17, № 5. P. 2945–2952.

93. Lebedev D. et al. 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, № 6. P. 51.

94. Di Fiori N. et al. Optoelectronic control of surface charge and translocation dynamics in solid-state nanopores // Nature nanotechnology, 2013. Vol. 8, № 12. P. 946–951.

95. Krane N. et al. Electronic structure and luminescence of quasi-freestanding MoS2 nanopatches on Au (111) // Nano Letters, 2016. Vol. 16, № 8. P. 5163–5168.

96. Fromm D.P. et al. Gap-dependent optical coupling of single “bowtie” nanoantennas resonant in the visible // Nano letters, 2004. Vol. 4, № 5. P. 957–961.

97. Johnson P. B., Christy R. W. Optical constants of the noble metals //Physical review B, 1972. Vol. 6, № 12. P. 4370.

98. Ozaki Y. et al. Far-ultraviolet spectroscopy in the solid and liquid states: A review // Applied Spectroscopy, 2012. Vol. 66, № 1. P. 1–25.

99. Robertson J., Powell M.J. Gap states in silicon nitride // Applied Physics Letters, 1984. Vol. 44, № 4. P. 415–417.

100. Ryzhkov I.I. et al. Growth of carbon nanotubes inside porous anodic alumina membranes: Simulation and experiment // International Journal of Heat and Mass Transfer, 2021. Vol. 176. P. 121414.

101. Davies P. F., Rennke H. G., Cotran R. S. Influence of molecular charge upon the endocytosis and intracellular fate of peroxidase activity in cultured arterial endothelium //Journal of Cell Science, 1979. Vol. 49, № 1. P. 69–86.

102. Sanders S.A. et al. pH-dependent properties of a mutant horseradish peroxidase isoenzyme C in which Arg38 has been replaced with lysine // European journal of biochemistry, 1994. Vol. 224, № 3. P. 1029–1037.

103. Ivanov Y.D. et al. Registration of Functioning of a Single Horseradish Peroxidase Macromolecule with a Solid-State Nanopore // International Journal of Molecular Sciences, 2023. Vol. 24, № 21. P. 15636.

104. Almond J.B., Cohen G.M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy // Leukemia, 2002. Vol. 16, № 4. P. 433–443.

105. Masuda H., Fukuda K. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina //science, 1995. Vol. 268, № 5216. P. 1466–1468.

106. Афоничева П.К. Разработка микрофлюидных устройств с интегрированными твердотельными наноструктурами для регистрации биомолекул. Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук. Специальность 1.3.2. Санкт-Петербург, Институт аналитического приборостроения РАН, 2025. С. 137.