

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Афоничева Полина Константиновна

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ С ИНТЕГРИРОВАННЫМИ
ТВЕРДОТЕЛЬНЫМИ НАНОСТРУКТУРАМИ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ
БИОМОЛЕКУЛ

Специальность 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук,
Евстрапов Анатолий Александрович

Санкт-Петербург 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Литературный обзор.....	12
1.1 Микро- и наноструктуры для биомедицинских исследований	12
1.2 Технологии и материалы для изготовления микро- и наноструктур и их интеграция в микрофлюидные чипы.....	15
1.3 Свойства нанопор и наноканалов: ионный транспорт, селективность.....	22
1.4 Способы управления транспортом биомолекул в микро- и наноструктурах	35
1.5 Особенности экспериментальных исследований с использованием наноразмерных устройств	46
1.6 Области применения наноструктур: обнаружения молекул, биодатчики, секвенирование.....	54
1.7 Заключение к литературному обзору.....	61
2 Изготовление микрофлюидного устройства и исследование транспортных свойств наноканалов	64
2.1 Изготовление микрофлюидного устройства с наноканалами	64
2.2 Изучение транспортных свойств наноканалов	71
2.3 Заключение ко 2 главе	76
3 Твердотельные нанопоры в свободно-подвешенной мембране SiN _x /Si: изготовление, подготовка, методика измерений.	78
3.1 Изготовление полупроводниковых мембран SiN _x /Si с интегрированными нанопорами	78
3.2 Разработка экспериментальных образцов электрохимической измерительной ячейки	81

3.3	Протокол подготовки электрохимической ячейки и методика измерений ионного транспорта в SiN_x/Si мембранах с интегрированными нанопорами.....	85
3.4	Исследования ионного транспорта в SiN_x/Si мембранах с нанопорами....	93
3.5	Заключение к 3 главе	97
4	Экспериментальные исследования: выделение и обнаружение нуклеиновых кислот в пробе.....	99
4.1	Пробоподготовка. Микрофлюидный чип для выделения НК	99
4.2	Исследование возможности детектирования фрагментов ДНК в электрохимической ячейке с одиночной нанопорой в SiN_x/Si мембране.....	103
4.3	Заключение к 4 главе	113
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
	Благодарности.....	119
	ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	120
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	121

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается значительный интерес к междисциплинарным исследованиям, направленным на создание устройств с интегрированными микро- и наноструктурами для биомедицинских применений [1], концентрации и выделения нуклеиновых кислот (НК) [2,3], анализа и детектирования одиночных биомолекул [4], секвенирования НК [5,6]. Сочетание методов микро- и нанофлюидики с технологиями микроэлектроники используется для разработки новых устройств, например, высокочувствительных химических и биологических сенсоров [7], принцип действия которых основан на взаимодействии исследуемого объекта с твердотельными наноразмерными структурами (нанопоры и наноканалы) в мембранах [8].

Нанопоры и наноканалы встречаются в живых системах, а также могут быть сформированы в искусственных материалах. Транспорт ионов и молекул в живых системах, содержащих биологические наноканалы, регулируется благодаря своей геометрической форме, составу и свойствам поверхности. Перспективным является создание искусственных (биомиметических) аналогов наноканалов для изучения механизмов переноса ионов и молекул в наноструктурах [9] и последующая разработка новых приборов и устройств, в частности, актуальным направлением является нанопоровое детектирование.

Существует два основных типа нанопор, биологические и твердотельные. Биологические нанопоры представляют собой специально подобранные или искусственно синтезированные транспортные белки, интегрированные в липидные мембраны. Биологические поры применяются при секвенировании ДНК и исследовании трансмембранного транспорта биологических молекул, однако обладают рядом существенных недостатков, такими как ограниченный срок службы и строгие условия хранения и использования (температура, состав и концентрация электролита, величина pH), что значительно ограничивает возможности их применения. Твердотельные нанопоры являются перспективным аналогом, поскольку обладают высокой механической, термической и химической стабильностью [10], широкими возможностями по модификации поверхности,

сочетанию с другими методами детектирования [11], долговечностью и возможностью серийного производства.

Развитие современных методов изготовления твердотельных наноструктур позволяет создавать нанопоры и наноканалы контролируемых форм и размеров, соизмеримых с размерами многих биологических молекул и анализируемых веществ. Использование наноструктур в качестве чувствительного элемента устройства позволяет осуществлять одномолекулярное детектирование, то есть обнаружение и регистрацию на уровне одиночных молекул (белки, НК), которому характерны высокие чувствительность и специфичность, позволяющие повысить точность исследования [12]. Использование наноструктур для детектирования одиночных молекул дает возможность получать длинные прочтения последовательности ДНК, позволяет убрать этап предварительной амплификации методами ПЦР и обеспечивает высокую скорость анализа. Помимо этого, появляется возможность для безметочного секвенирования НК [13].

Для создания твердотельных нанопор в тонких мембранах используются такие материалы как SiN_x [14], SiO_2 [15], а также двумерные (2D) материалы, например, графен, MoS_2 [16], MXene [17,18]. В исследованиях для изготовления нанопоровых устройств чаще встречается использование мембран из нитрида кремния [19], которые обладают хорошей химической стабильностью и возможностью модификации поверхности [20]. Наиболее распространенным методом формирования нанопор в мембране SiN_x является травление сфокусированным электронным или ионным лучом [21]. Этот метод позволяет точно контролировать размер пор (<1 нм) и конфигурацию.

В большинстве случаев нанопоровый сенсор представляет собой тонкую мембрану с одиночной нанопорой, которая соединяет два независимых объема (*cis*- и *trans*-) измерительной ячейки, заполненной буферным раствором электролита.

Детектирование НК с использованием нанопор основывается на нескольких принципах, связанных с регистрацией электрического тока. Среди них можно выделить измерение а) тока ионной блокады, б) поперечного туннельного тока и в) изменения емкости нанопоры. Измерение туннельного тока и изменения емкости

могут быть реализованы только в твердотельных нанопорах и требуют интеграции электродов непосредственно в пору, что является сложной технической задачей.

Детектирование ионного тока является одним из наиболее распространенных и широко применяемых способов регистрации сигнала в методах секвенирования. В его основе лежит принцип измерения ионного тока, протекающего через пору под воздействием приложенного внешнего электрического поля. Во время транслокации (перемещения) молекулы из *cis*- в *trans*-объем, внутреннее пространство нанопоры частично блокируется, что приводит к изменению её проводимости и ионного тока. Так, изменение регистрируемого сигнала свидетельствует о прохождении молекулы аналита через пору, при этом амплитуда и форма полученного сигнала зависят от размера, формы, длины, а также от заряда и конформации детектируемых молекул [22].

Важную роль в процессе детектирования играет обработка полученных сигналов и определение события транслокации. Большинство существующих методов поиска транслокаций заключается в идентификации событий, связанных со скачкообразным изменением уровня ионного тока. В таком случае изменения тока ранжируются и исключаются при достижении определенного порогового значения (триггера).

Несмотря на ряд преимуществ, устройства с твердотельными нанопорами еще не достигли достаточной чувствительности, необходимой для секвенирования НК, обнаружения белков, НК и других молекул. Это связано с высокой скоростью электрофоретической транслокации биомолекул, вызванной сильной локализацией электрического поля в области поры, а также низким отношением сигнал/шум [23]. Помимо этого, окончательно не изучен сложный механизм взаимодействия между исследуемой молекулой и поверхностью поры в момент транслокации. Так ключевой задачей является исследование ионного и молекулярного транспорта, в частности, свойств селективности, которые обусловлены зарядом и возникновением двойного электрического слоя на поверхности наноструктур.

Разработка твердотельного нанопорового биосенсора для исследований ионного и молекулярного транспорта в твердотельных нанопорах/наноканалах представляет собой перспективную научную задачу.

Цель работы

Целью диссертации является разработка и создание устройства для обнаружения (регистрации) молекул ДНК с использованием измерения ионного тока при транслокации молекул через твердотельные нанопоры/наноканалы.

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

1 Разработать и изготовить кремний-стеклянное микрофлюидное устройство (МФУ) с наноканалами методами оптической литографии и травления сфокусированным ионным лучом. Исследовать ионный транспорт в наноканалах методами измерения ионной проводимости и оптической микроскопии.

2 Разработать и изготовить электрохимическую измерительную ячейку (в дальнейшем электрохимическая ячейка), содержащую *cis*- и *trans*- объемы со встроенной SiN_x/Si мембраной с одиночной нанопорой, с применением метода фотополимерной 3D печати.

3 Разработать: а) протокол подготовки электрохимической ячейки, б) методику проведения эксперимента для исследования влияния концентрации электролита на проводимость нанопоры.

4 Исследовать ионный транспорт в твердотельной SiN_x/Si мембране с одиночной нанопорой при изменении концентрации электролита KCl .

5 Исследовать возможность автоматизации и оценить эффективность выделения НК на магнитных частицах в чипах из полидиметилсилоксана (ПДМС) в сравнении с ручным выделением с целью дальнейшего использования данной процедуры для экспериментальных исследований молекул.

6 Исследовать возможность детектирования фрагментов ДНК различной длины с помощью электрохимической ячейки с одиночной нанопорой в SiN_x/Si мембране.

Научная новизна

1 Разработан новый способ создания устройства с наноразмерными каналами, сочетающий методы оптической литографии и травления сфокусированным ионным лучом, позволяющий изготовить кремний-стеклянные микрофлюидные устройства с системой микро- и наноканалов заданной геометрии и контролируемыми размерами. Герметизация анодным свариванием обеспечивает сохранение свойств устройства на срок не менее трех месяцев и устойчивость к агрессивным средам (некоторые кислоты и щелочи).

2 Разработаны: оригинальная электрохимическая ячейка, содержащая твердотельную SiN_x/Si мембрану с одиночной нанопорой, обеспечивающая герметичность системы, защиту от загрязнения и образования пузырей газа в процессе измерения, и новый протокол для подготовки и исследования транслокаций молекул, позволяющие получить воспроизводимые экспериментальные результаты.

3 Разработана новая процедура анализа данных, позволяющая оценивать события транслокаций по пороговому значению, которая использовалась для обнаружения событий транслокаций для фрагментов ДНК длиной 10000 п.о., и построения зависимости амплитуды транслокаций от их длительности и оценки частоты событий.

4 Впервые экспериментально выявлена зависимость продолжительности транслокаций от длины при детектировании фрагментов ДНК с длинами 5000 и 500 п.о. Продемонстрировано, что при данных длинах фрагментов продолжительность транслокаций различается на 35%.

Практическая значимость

1 Разработан и апробирован новый способ создания многоразовых кремний-стеклянных МФУ с наноканалами заданной геометрии и контролируемыми размерами, устойчивых к давлению до 202,65 кПа и агрессивным средам (некоторые кислоты и щелочи), позволяющих осуществлять экспериментальные исследования с биомолекулами. Способ может быть

использован для создания МФУ с селективным транспортом для биомедицинских применений.

2 Разработана и апробирована конструкция электрохимической ячейки с SiN_x/Si мембраной с нанопорой, с помощью которой проведены исследования по обнаружению единичных молекул (фрагменты ДНК).

3 Разработан и апробирован протокол подготовки электрохимической ячейки с интегрированной свободно-подвешенной мембраной с одиночной нанопорой, позволяющий повысить точность и воспроизводимость измерений за счет герметичности системы и устранения образования пузырьков газа в области поры.

4 Продемонстрированная возможность электрохимического детектирования одиночных молекул ДНК с помощью твердотельной нанопоры, а также способность различать фрагменты ДНК разных размеров, является основой для создания твердотельного нанопорового сенсора.

Положения, выносимые на защиту

1 Метод оптической литографии в сочетании с травлением сфокусированным ионным лучом позволяют формировать микро- и наноразмерные структуры с воспроизводимыми характеристиками (ширина ~ 50 нм, глубина ~ 10 нм). Последующая герметизация полученных структур анодным свариванием со стеклянной пластиной позволяет создавать многоразовые микрофлюидные устройства с наноканалами, устойчивыми к воздействию агрессивных сред (некоторые кислоты и щелочи).

2 Созданная экспериментальная установка и разработанный протокол подготовки электрохимической ячейки с нанопорой в SiN_x/Si мембране обеспечивают герметичность системы, препятствуют ее возможному загрязнению и позволяют получить воспроизводимые результаты при исследовании ионного транспорта в нанопорах.

3 Нелинейная зависимость проводимости нанопоры от концентрации электролита KCl в диапазоне концентраций от $0,1$ мМ до 1 М, обусловленная

распределением двойного электрического слоя на стенках нанопоры, подтверждает наличие зарядовой селективности.

4 Продемонстрировано детектирование транслокаций фрагментов ДНК разной длины с помощью электрохимической ячейки, содержащей свободно-подвешенную SiN_x/Si мембрану с одиночной нанопорой длиной 40 нм и диаметром 5 нм. Результаты экспериментов по детектированию фрагментов ДНК 5000 и 500 п.о. показали значимое отличие в продолжительности транслокаций от длины молекул.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международная конференция "Физика.СПб" 22-24 окт. 2019 (СПб, Россия), Saint-Petersburg OPEN2020" 26-30 April 2020 (St.Petersburg, Russia), Международная конференция "Физика.СПб" 18–22 окт. 2021 (СПб, Россия), 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), XV Юбилейная всероссийская научная конференция (с международным участием «МЕМБРАНЫ-2022» (Москва, Россия), International conference «Ion transport in organic and inorganic membranes-2023» 22 – 27 May, 2023 (Sochi, Russia), Всероссийская конференция по электрохимии с международным участием «ЭЛЕКТРОХИМИЯ-2023» 23-27 Октября 2023 (Москва, Россия), II ежегодная всероссийская молодежная конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2023» (СПб, Россия), III ежегодная всероссийская молодежная конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2024» (СПб, Россия).

Личный вклад автора

Автор участвовал в постановке цели и задач исследований, анализе литературных источников по теме диссертации, экспериментах по исследованию транспортных свойств наноканалов методом измерения ионной проводимости и методом конфокальной оптической микроскопии, разработке и создании

измерительной электрохимической ячейки и протокола ее подготовки, а также протокола для изучения механизмов селективного ионного транспорта в твердотельных нанопорах, проведении экспериментальных исследований селективного ионного транспорта в твердотельных нанопорах и наноканалах и транслокаций фрагментов ДНК разной длины, обработке и анализе результатов исследований, подготовке научных публикаций по тематике исследования, представлении результатов работы на конференциях, а также в оформлении отчетов по темам НИР и грантам РФФИ. Основные результаты, представленные в диссертации, получены лично автором.

Публикации

Основные научные результаты опубликованы в 12 печатных трудах, из которых 5 входят в перечень журналов ВАК, 7 публикаций — в международные реферативные базы данных и систему цитирования Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения и списка литературы из 180 наименований. Текст диссертации изложен на 135 страницах, содержит 51 рисунок и 1 таблицу.

1 Литературный обзор

1.1 Микро- и наноструктуры для биомедицинских исследований

Микрофлюидные устройства имеют широкий спектр применений: в персонализированной медицине [24], при диагностике заболеваний [25], культивировании клеток и тканей [26], для создания устройств «орган-на-чипе» [27], секвенировании НК [28] и т.д. Продолжающиеся исследования и разработки в этой области могут привести к созданию новых технологий и методов в биологических, фармацевтических и медицинских исследованиях [29].

Использование микрофлюидных систем позволяет существенно сократить время анализа, уменьшить количество образцов и реагентов. При объединении микрофлюидных каналов с другими функциональными элементами, например, электродами, датчиками или наноструктурами, все процессы анализа, такие как пробоподготовка, разделение и детектирование образцов могут быть выполнены в автоматическом режиме на одном устройстве. Такой подход минимизирует влияние человеческого фактора и окружающей среды на результат исследования, повышает надежность анализа, а также снижает затраты на проведение исследования [30].

МФУ позволяют проводить исследования различных образцов, такие как кровь, слюна или клеточные ткани [31], для быстрой и точной медицинской диагностики. На МФУ могут быть реализованы методы иммунного, биохимического и молекулярно-генетического анализа. К последним относятся методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), амплификации нуклеиновых кислот (НК), методы секвенирования. Перед проведением исследования эти методы требуют пробоподготовки, которая включает в себя несколько стадий, например, для генетического анализа – лизис и выделение НК. Для автоматизации этого процесса, методы подготовки образца реализуются, в том числе, в микрофлюидных системах. Интеграция пробоподготовки в МФУ с методами детектирования сокращает общее время и стоимость исследования за счет уменьшения количества образца и расхода реагентов, а также использования преимущества протекания реакций в микромасштабе. Кроме того, в МФУ весь

процесс подготовки пробы осуществляется в закрытой системе, что снижает вероятность перекрестного загрязнения [32].

Выделение нуклеиновых кислот с помощью магнитных частиц широко используется для захвата и манипулирования нуклеиновыми кислотами внутри микрофлюидного чипа. Этот метод позволяет осуществить экстракцию нуклеиновых кислот из сложных смесей путем комплементарной гибридизации [33]. В последние годы был достигнут большой прогресс в соединении функционализированных магнитных частиц с подходящими буферными системами, что позволяет проводить быструю и эффективную процедуру выделения и пробоподготовки [34]. Стадия центрифугирования, используемая в традиционных методах и вызывающая разрушение нуклеиновых кислот, отсутствует в методе, использующим магнитные частицы, что позволяет сохранять неповрежденными более длинные фрагменты геномной ДНК [35].

Поимо этого микрофлюидные устройства могут быть использованы для синтеза оптически чувствительных наночастиц (НЧ). Размер функциональных структур (каналы, реакционные камеры и т.д.) в микрофлюидных устройствах позволяет с высокой воспроизводимостью манипулировать жидкостями на микро- и наноуровнях, обеспечивает хороший массо- и теплообмен, и высокую производительность. Основное преимущество применения микрофлюидной технологии для синтеза НЧ заключается в точном и воспроизводимом контроле физико-химических свойств получаемых частиц путем прецизионной настройки скорости потока реагентов, времени и условий их смешивания. По сравнению с традиционным синтезом использование микрофлюидных устройств для производства НЧ обеспечивает: а) гораздо более высокую производительность, б) лучшее качество формируемых образцов (контролируемый размер и распределение по размерам) и в) низкий расход реагентов [36].

Другой аспект применения МФУ связан с изучением влияния НЧ на организмы. Использование микрофлюидных устройств для тестирования НЧ *in vitro*, вероятно, в ближайшие годы будет расширяться, чтобы заполнить существующий пробел между экспериментами *in vitro* и экспериментами на

животных/человеке. Микрофлюидные технологии позволяют создавать конкретную микросреду для исследований с контролируемыми параметрами (например, температурой, pH и градиентами концентраций веществ), имеющими большее сходство с реальным организмом, чем в случае традиционных методов культивирования клеток. Объединение микрофлюидики и методов формирования клеточных 3D-структур повлекло за собой создание нового направления «орган-на-чипе», микрофлюидного устройства, имитирующего живой орган. Для реализации «органа-на-чипе» внутри микрофлюидного устройства выращиваются клетки для формирования тканей или органов, чтобы имитировать и исследовать их работу.

Развитие платформ «орган-на-чипе» и «организм-на-чипе» дает возможность моделировать и изучать процессы, связанные с доставкой лекарственных средств с помощью НЧ. Разработка моделей заболеваний и их изучение в «микрочиповом» формате позволит оценить безопасность и терапевтическую эффективность применения НЧ. Моделируя взаимодействие между несколькими органами на одном чипе, исследователи могут создать более физиологически релевантную среду для изучения влияния НЧ и оптимизировать их возможности доставки лекарств.

Большой интерес помимо микрофлюидики представляет нанофлюидика – это область, изучающая поведение потоков жидкости в каналах/порах, по крайней мере, с одним характерным размером менее 100 нм [37]. Наноструктуры обладают рядом особенностей, таких как сверхвысокое отношение поверхности к объему, размерными масштабами, сопоставимыми с диапазоном действия различных поверхностных/межфазных сил и размерами биомолекул (ДНК, РНК, белки). Эти особенности позволяют реализовывать уникальные транспортные явления, которые происходят только на наноуровне. Сильное электростатическое взаимодействие между заряженной поверхностью наноканала и ионами в наноканале приводит к образованию перекрывающихся двойных электрических слоев и, за счет этого, к селективному транспорту ионов, управляемому поверхностным зарядом.

Если длина поры намного больше диаметра, то структуру обычно называют наноканалом. В зависимости от количества пор или каналов твердотельные нанопоры и наноканалы подразделяют на одиночные нанопоры/наноканалы и мультинанопоры/мультинаноканалы. Одиночные нанопоры представляют собой мембраны с только одной нанопорой, в то время как мультинанопоры – это мембрана с массивом нанопор. В настоящее время для изготовления искусственных нанопор и наноканалов в различных синтетических материалах используются разнообразные методы, таким образом обеспечивая получение нанопор и наноканалов разных размеров и конфигураций.

Быстрое развитие технологий для изготовления микро и-наноструктур дает возможности интегрировать нанопоры/наноканалы с МФУ, тем самым открывая новое направление, нацеленное на разработку нанофлюидных устройств. Совмещение МФУ с наноструктурами позволяет изучать биофизические и биохимические процессы на качественно новом уровне. Опираясь на возникающие на наноуровне эффекты, нанопоры/наноканалы находят применение во многих областях, включая анализ отдельных молекул, исследование белков, а также секвенирование ДНК [38].

1.2 Технологии и материалы для изготовления микро- и наноструктур и их интеграция в микрофлюидные чипы

В зависимости от предполагаемого применения, одним из основных этапов в изготовлении микро- или нанофлюидной структуры является выбор материала и метода изготовления. функционирования устройств с подобными структурами в значительной степени определяется выбором материала, поскольку на микро- и наномасштабе свойства поверхности оказывают существенное влияние на физические процессы. В этом контексте поверхностное натяжение становится доминирующим фактором по сравнению с макромасштабом. Другими важными факторами, которые необходимо учитывать при выборе материала являются долговечность, простота изготовления, биосовместимость, химическая инертность с предполагаемыми реагентами, соответствие условиям температуры и давления,

необходимым для работы, а также возможность функционализации и модификации поверхности [39,40].

Для изготовления микрофлюидных устройств используется множество материалов, которые соответствуют предъявляемым требованиям [41,42]. На начальном этапе развития МФУ изготавливались из кремния, стекла или кварца с применением хорошо изученных процессов микрообработки, фотолитографии, травления и осаждения [43,44]. В настоящий момент к типичным материалам, помимо вышеуказанных, можно отнести ряд металлов, полимерных материалов, керамику [45–47].

Кремний является весьма популярным материалом, благодаря его доступности и химической инертности [48]. Простота изготовления, полупроводниковые свойства и возможность модификации поверхности предоставили достаточно оснований для того, чтобы кремний оставался доминирующим материалом для микрофлюидных устройств на протяжении десятилетий [46]. Однако при использовании этого материала в практических целях необходимо учитывать ряд специфических особенностей. Наиболее очевидным ограничением является непрозрачность кремния, что делает его несовместимым для оптического обнаружения в видимой и ультрафиолетовой областях [49]. Если требуется визуализация *in situ*, по крайней мере, часть устройства должна быть не кремниевой [50], например, как в кремний-стеклянных чипах, где герметизация осуществляется стеклянной пластиной. Кроме того, будучи довольно хрупким и имеющим высокий модуль упругости, включение активных компонентов, т.е. клапанов и насосов, в кремниевую или кремний-стеклянную платформу является технологически сложным процессом [46]. Помимо этого, кремний относительно дорогой материал, а технологические процессы по созданию в нем структур требуют сложного и дорогостоящего оборудования [48,51]. Тем не менее, кремниевые микрофлюидные платформы находят применение в биологических приложениях, таких как медицинская диагностика *point-of-care*, в частности, для скрининга токсичности лекарств [51].

Стекло химически инертно, термостойко [52], обладает диэлектрическими свойствами [49], и обеспечивает возможность функционализации поверхности [47], а также некоторые виды стекол биологически совместимы [51]. Эти свойства делают МФУ на основе стекла пригодными для проведения химических реакций, требующих экстремальных условий: высоких температур, высокого давления и агрессивных растворителей [45]. По сравнению с кремнием стекло обладает превосходной оптической прозрачностью [41]. Кроме того, термическая и химическая стабильность стекла позволяет эффективно восстанавливать устройство после окончания эксперимента, либо нагревая чип, либо/и промывая его химическими веществами [52]. Чипы обычно изготавливаются из натриево-кальциевого стекла, боросиликатного стекла и плавленого кварца [41]. Несмотря на доступность материала, для изготовления микрочипов из стекла требуется технологически трудоемкий и дорогостоящий процесс [50].

Самыми популярными материалами для изготовления МФЧ в настоящее время являются полимеры. По сравнению с неорганическими материалами полимеры довольно недорогие и требуют более простые и доступные технологии производства [42]. Полимерные МФУ могут быть использованы в самых разных областях: от синтеза наночастиц до изготовления биодатчиков и «органов-на-чипе» [53]. МФЧ, изготовленные из полимеров, подходят для применения как при комнатной температуре, так и при более высоких температурах (до 200°C) [45]. Кроме того, прозрачные или полупрозрачные полимерные материалы обеспечивают возможность оптического детектирования. Наиболее распространенные полимеры, используемые для изготовления микрофлюидных устройств, полидиметилсилоксан (PDMS, ПДМС), полиметилметакрилат (PMMA, ПММА), фторполимеры, циклоолефиновые полимеры и сополимеры (COPs/CoCs) и тиоловые полимеры (TEs).

Одним из наиболее популярных и распространенных в микрофлюидике материалов является эластомер ПДМС. ПДМС (в частности, Sylgard 184, Dow Corning) может быть использован для прототипирования устройств, обладает оптической прозрачностью, газопроницаемостью, биосовместимостью, низкой

автофлуоресценцией, естественной гидрофобностью и высокой эластичностью [51]. Благодаря перечисленным свойствам ПДМС применяют для исследований, связанных с культивированием клеток и биохимическими анализами [54]. С помощью МФЧ из ПДМС можно исследовать бактерии, а также белки и ДНК/РНК. Тонкие мембраны, изготовленные из ПДМС, также могут быть использованы в качестве функциональных элементов для клапанов и насосов [46]. Однако те же самые свойства (пористость, эластичность) становятся препятствиями в случае применения материала в органическом синтезе, т.к. ПДМС является пористым материалом и характеризуется плохой стойкостью к органическим растворителям (например, гексану, толуолу и хлороформу) [55], а паропроницаемость через стенки канала может приводить к локальным изменениям концентрации раствора.

В силу того, что каждый из материалов характеризуется разными свойствами, методы изготовления МФУ должны быть адаптированы к конкретным материалам и требованиям к конечному продукту. Достаточно важным аспектом при выборе технологии изготовления является стоимость, так как МФУ чаще всего используются в качестве одноразовых, а для широкого внедрения устройства должны быть изготовлены доступным и масштабируемым способом.

В настоящее время используется множество методов изготовления [56], которые можно классифицировать в зависимости от того, как создается микрофлюидная структура: путем удаления материала (методы удаления) или путем осаждения материала (методы осаждения) [57]. Другая классификация разделяет методы изготовления в зависимости от характера используемых процессов, а именно: химические, механические (микрообработка) [58], лазерные и другие процессы [41].

Для изготовления стеклянных и кремниевых микрофлюидных каналов принято использовать химические технологические процессы [57]. Наиболее распространенными являются «мокрое» и «сухое» травление, а также электрохимическая обработка. «Мокрое» травление стало популярным благодаря высокой скорости травления и возможности одновременной обработки большого количества пластин, в которых формируются структуры [41]. Этот метод требует

сильнодействующих химических веществ для удаления материала, и предпочтительным травителем обычно является плавиковая кислота [59,60]. Использование кислоты и высоко коррозионных травителей в данной технологии изготовления может представлять опасность для здоровья и окружающей среды [61]. Другой особенностью является получающийся изотропный профиль вытравленных каналов, так как жидкостное травление не позволяет достигнуть высоких аспектных соотношений [59]. Напротив, методы сухого травления (ионное травление, ионно-химическое травление, плазмо-химическое травление или реактивное ионное травление), позволяют создавать анизотропные, точные микромасштабные профили каналов. Сухое травление рекомендуется для прозрачных подложек, но не является предпочтительным из-за более низких скоростей по сравнению с мокрым травлением и низкой селективности по отношению к маске [59].

Литье под давлением является распространенным методом обработки полимеров [62]. Несмотря на его преимущества с точки зрения затрат и простоты метода, основными ограничениями микролитьевого формования являются ограничения по материалу (только термопласты) и пространственному разрешению. Подобно литью под давлением, горячее тиснение основано на плавлении термопластов и придании им формы с помощью давления и тепла [56]. Однако вместо впрыскивания полимера в полость мастер-формы материал заливается и прижимается к форме таким образом, что желаемые свойства передаются от отливки к размягченному полимеру [63]. Это различие позволяет снизить остаточные напряжения в обрабатываемом материале. Кроме того, благодаря меньшей усадке отлитой детали можно получить более тонкие конструкции [56].

«Мягкая» литография является одним из наиболее популярных методов изготовления микрофлюидных устройств [64]. Этот метод, встречающийся в литературе под названием «replica molding» или «soft lithography» [56], позволяет формировать паттерны (узоры) в эластомере, например ПДМС [65]. Мягкая литография подразумевает несколько этапов, а именно: создание оригинальной

мастер-формы, заливка жидкого полимера в форму, термообработка и освобождение из формы реплики/отливки из полимера. Таким образом, создается литая реплика из эластичного материала, который в дальнейшем используется для создания МФУ [66]. Основными преимуществами этого метода являются получение реплик с высоким разрешением до 6 нм, и более быстрое производство в условиях исследовательских лабораторий по сравнению с другими методами. Что касается ограничений, то они в основном связаны с точной копией мастер-формы. В частности, поскольку используемые материалы являются мягкими, может произойти деформация каналов, особенно при извлечении отливки из формы [56]. Еще одним относительным недостатком является то, что мягкая литография – это процесс, предполагающий дорогостоящие методы фотолитографии для создания мастер-форм [67]. Мастер-формы изготавливаются с помощью разных методов. Для создания стеклянной мастер-формы используется метод фотолитографии и жидкостного травления.

Метод с использованием стандартной фотолитографии с негативного фоторезиста SU-8 на кремниевой пластине наиболее распространен в исследовательских лабораториях. При наличии необходимой мастер-формы, само изготовление микрофлюидных устройств методом мягкой литографии удобно и не требует сложного оборудования.

Современные технологии позволяют интегрировать наноразмерные структуры (наноканалы/нанопоры) в конструкцию микрофлюидного устройства [68]. Микроканалы в этом случае будут выступать в качестве подводящих магистралей к наноструктурам.

Существует несколько методов, которые могут быть использованы для формирования наноканалов в МФУ [69,70]: фотолитография [71], интерференционная литография [72], наноимпринтинг [73] или осаждение тонких пленок [74]. Первые два метода позволяют изготавливать наноканалы из различных материалов с заданной геометрией, но из-за характера процессов затруднительно получить каналы размером менее 50 нм. Альтернативными методами получения одиночных наноканалов являются ионная и электронно-

лучевая литография (особенно травление сфокусированным ионным пучком, focused ion beam, FIB) [75]. Такой метод позволяет преодолеть дифракционный предел—стандартной фотолитографии. Применяя эти методы, можно получить каналы различной геометрии с разрешением до нескольких нанометров [76].

Разрешение обычной фотолитографии ограничено длиной волны падающего света несмотря на то, что современные приборы для фотолитографии в полупроводниковой промышленности допускают формирование структур с минимальными размерами элементов до 22 нм. Подобное разрешение подходит для изготовления микроканалов в МФУ, но намного больше критического размера, требуемого для изготовления наноструктур, таких как нанопоры и наноканалы, для детектирования одиночных молекул.

Одной из главных ограничений в технологии изготовления нанопор является создание пор с диаметром и толщиной сопоставимыми с размером биологической молекулы для увеличения отношения сигнал/шум (при электрическом детектировании). Для создания твердотельных нанопор в тонких мембранах могут использоваться разнообразные материалы, такие как SiN_x [14,77], SiO_2 [15], а также двумерные (2D) материалы такие как графен, MoS_2 [16], MXene [17,18]. 2D-материалы позволяют создавать поры толщиной в 1 монослой, что сравнимо с расстоянием между нуклеотидами, обеспечивая таким образом высокую чувствительность. Тем не менее, в исследованиях для изготовления нанопоровых устройств чаще встречается использование мембран из нитрида кремния SiN_x [19], которые обладают хорошей химической стабильностью и возможностью модификации поверхности [3,20].

Наиболее распространенным методом формирования нанопор в мембране SiN является травление сфокусированным электронным/ионным лучом [78]. Этот метод позволяет точно контролировать размер пор (<1 нм) и конфигурацию. Методика ионно-лучевого формирования (ion beam sculpting), описанная в работе [79], использовалась для создания отдельных нанопор в тонких свободно-подвешенных мембранах из нитрида кремния. Ионный луч фокусировался на мембране, чтобы открыть крошечное отверстие диаметром до нескольких

нанометров. В качестве альтернативы электронный луч из просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) или растрового электронного микроскопа (РЭМ) может быть использован для сверления и формирования пор нано- или субнанометровой длины в сверхтонких свободно-подвешенных мембранах Si, SiN_x или SiO₂, графеновых мембранах толщиной 1—5 нм и монослоях графена [21].

Другими методами изготовления являются химическое травление, контролируемый пробой диэлектрика (controlled dielectric breakdown - CBD) [80] или атомно-слоевое осаждение (ALD) [74].

Метод CBD основан на эффекте контролируемого пробоя диэлектрика [81]. Момент пробоя диэлектрика, вызванного напряжением, в ультратонких мембранах приводит к образованию одиночных нанопор диаметром 1 нм. Этот пробой может быть вызван созданием сильного электрического поля через изолирующую мембрану. Для изготовления нанопор этим методом не требуется сложного оборудования, а такая установка может быть изготовлена в условиях исследовательской лаборатории. При оптимальных параметрах создания одной нанопоры, методом CBD можно получать нанопоры с воспроизводимостью в субнанометровом масштабе [82,83]. Этот метод также позволяет изготавливать массив нанопор в мембранах [84,85].

1.3 Свойства нанопор и наноканалов: ионный транспорт, селективность

Нанопоры представляют собой универсальный инструмент для безметочного обнаружения и анализа нуклеиновых кислот и белков, применение которого варьируется от биосенсоров до устройств секвенирования. В основе метода лежит контроль за перемещением отдельных биомолекул (или их фрагментов) через нанопору посредством детектирования изменения электрического сигнала. Детектирование осуществляется в измерительной электрохимической ячейке, представляющей собой независимые *cis*- и *trans*- объемы, между которыми герметично фиксируется тонкая мембрана с одиночной нанопорой. При приложении разности потенциалов (несколько сотен мВ) к нанопоре возникает

ионный ток (в диапазоне от пА до нА). Процесс перемещения молекул через нанопору (событие транслокации, транспорт, перенос) сопровождается скачкообразным изменением (модуляцией) уровня регистрируемого ионного тока. Изменение ионного тока указывает не только на присутствие анализируемой молекулы, а также, в зависимости от формы и амплитуды сигнала, несет ценную информацию относительно ее свойств, таких как форма, размер, длина и заряд [86]. Типичные экспериментальные установки, а также типичные зависимости ионного тока от времени при детектировании ДНК показаны на рисунке 1.1.

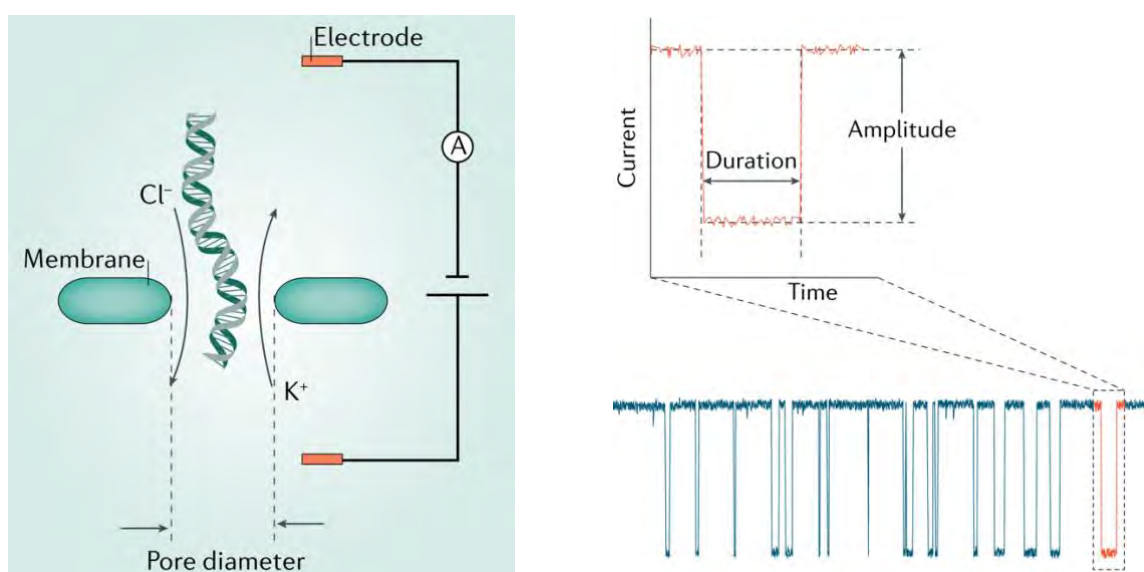


Рисунок 1.1 - Схема экспериментальной установки (не в масштабе).

Под действием электрического поля отрицательно заряженная молекула ДНК перемещается через нанопору (слева). Зависимости ионного тока от времени после добавления ДНК в раствор электролита. Скачки свидетельствуют о наличии событий транслокации, характеризующиеся продолжительностью и амплитудой (справа). [87]

В литературе в основном встречаются описания двух вариантов нанопор, применяющихся в аналитических целях: биологические нанопоры на основе порообразующих белков (α -HL, AeL, ClyA) [88] и твердотельные нанопоры на основе наноразмерных пор, изготовленных из неорганических материалов, таких как нитрид кремния или графен [89].

Хотя биологические нанопоры и имеют много преимуществ при их применении в системах секвенирования, таких как воспроизводимость размеров, большая длина прочтения (до 2 миллионов нуклеотидов), низкая стоимость секвенирования ДНК, они также обладают рядом недостатков. Во-первых, строгие требования к параметрам окружающей среды (например, температура, концентрация электролита и pH) биопор для сохранения их биологической активности, во-вторых, хрупкость липидного слоя, из-за которых биопоры легко разрушаются. Также белковые поры характеризуются ограниченным сроком использования и хранения из-за внутренней нестабильности природных белков [90].

По сравнению с белковыми нанопорами, твердотельные поры обладают высокой механической, термической и химической стабильностью, нечувствительностью к условиям внешней среды, долговечностью, а также возможностью изготовления пор разных размеров [91]. Помимо этого, существует возможность серийного производства, а также может реализовываться сочетание с другими методами детектирования, например, оптическим. Эти преимущества позволяют применять твердотельные нанопоры для создания биодатчиков для детектирования нуклеиновых кислот и белков.

На данный момент нанопоровое секвенирование ДНК коммерчески успешно реализовано только в белковых нанопорах [92]. Несмотря на ряд преимуществ, твердотельные нанопоры еще не продемонстрировали сенсорные свойства, необходимые для эффективного прочтения ДНК. Основным препятствием этому выступают высокая скорость транслокаций молекул, вызванная сильной локализацией электрического поля в области поры, в сочетании со сложным механизмом взаимодействия между молекулой ДНК и поверхностью поры. Эти эффекты приводят к регистрации коротких сигналов с низким соотношением сигнал/шум, что не позволяет реализовать эффективную идентификацию отдельных нуклеотидов в ДНК. Сильные поля обусловлены наноразмерами структуры и являются необходимым фактором для формирования уровня тока, превышающего тепловой шум, в то время как для преодоления барьеров,

определяемых конформационной энтропией, электростатическим отталкиванием и электроосмотическим потоком требуется приложить напряжение смещения не менее 20–60 мВ.

Несмотря на это, разработка твердотельных нанопоровых датчиков, способных полностью охарактеризовать детектируемые биомолекулы является хоть и сложной, но перспективной задачей.

Так, уменьшение толщины твердотельной мембраны является важным этапом в создании пор, поскольку толщина мембраны определяет разрешение при секвенировании. Если толщина мембраны соизмерима с длиной нескольких нуклеотидов, регистрация сигнала на уровне одного нуклеотида будет невозможна. Учитывая, что расстояние между соседними нуклеотидами в цепи ДНК составляет всего 0,34 нм, уменьшение толщины мембраны весьма важно для точного детектирования отдельных нуклеотидов.

Также технологической проблемой является контроль скорости прохождения ДНК через нанопору, так как время прохождения 1 нуклеотида через нанопору порядка 1 мкс. Поскольку необходимо регистрировать последовательность нуклеотидов, такое время слишком мало, чтобы воспроизводимо регистрировать сигнал на однонуклеотидном уровне с помощью доступных в настоящее время электронных систем [93,94]. Эта проблема также препятствует точному считыванию нуклеотидов по форме изменения электрического сигнала. Необходимое время, за которое один нуклеотид проходит сквозь пору должно быть по меньшей мере 100-1000 мкс для устойчивой регистрации электрического сигнала.

Большое количество исследовательских групп пытаются разработать эффективные методики для снижения скорости транслокации ДНК [95,96]. Наиболее успешным подходом для бионанопор является введение «молекулярного двигателя» вблизи входа в нанопору. «Молекулярные двигатели», такие как ДНК-полимераза или ДНК-геликаза, могут функционировать как молекулярный храповик нитей ДНК. Этот храповик может снижать скорость транслокаций ДНК и точно контролировать прохождение каждого нуклеотида [97]. Однако в

литературе нет подтверждений успешного применения «молекулярного двигателя» с твердотельной нанопорой.

Для снижения скорости транслокаций были предприняты попытки изменения следующих условий для раствора электролита: вязкость [98], вид электролита [99], температура [100] и градиент концентрации [101]. Некоторые группы исследователей попытались применить методику, в которой различные препятствия устанавливаются вблизи входа в нанопоры, чтобы снизить скорость, например, сетку из нановолокна [102], массив наногранул [103], полимерный гель [104] или наноцилиндры [105]. Таким образом, время прохождения нуклеотида может быть увеличено до ~10-100 мкс без внешних воздействий.

Твердотельные нанопоры и наноканалы могут быть использованы для создания «умных» нанопор и наноканалов с функциональными свойствами биологических ионных каналов. Так, еще одним преимуществом твердотельных нанопор является возможность химической модификации внутренней поверхности функциональными молекулами. Модификация поверхности использует конфигурацию структуры для достижения симметричного и асимметричного управления ионным транспортом внутри нанопор/наноканалов. Функционализация поверхности пор может быть реализована с помощью симметричной модификации, когда нанопоры и наноканалы с функциональными группами (карбокисильные группы) могут быть модифицированы различными функциональными молекулами посредством химической модификации в растворе через амидные связи [106]. Нанопоры и каналы с избыточными поверхностными зарядами могут быть модифицированы методом электростатической самосборки [107]. Асимметричная модификация чаще используется для функционализации наноканалов, поскольку наноканалы имеют большое соотношение сторон, чем нанопоры. Большое соотношение сторон наноканала позволяет создать градиент концентрации функциональных молекул внутри канала для реализации асимметричной модификации внутренней поверхности. Типичными методами асимметричной модификации являются ионное распыление [108], модификация функциональными молекулами в растворе [109], физическое/химическое

испарение [110], с помощью плазмы [111], и асимметричные методы самосборки [112].

Селективность

В настоящее время основное свойство биологических ионных наноканалов, а именно ионная селективность, было успешно продемонстрировано в твердотельных нанопорах и наноканалах [113].

Биологические мембраны содержат каналы с уникальной ионной селективностью, которые пропускают или не пропускают ионы определенного типа, например K^+ или Cl^- . Подобно биологическим ионным каналам, селективность ионов и молекул внутри твердотельных нанопор/наноканалов можно эффективно управлять, изменяя размер [114], заряд [115] и смачиваемость пор/каналов или используя связанные рецепторы, способные к селективному молекулярному распознаванию [116]. Нанопоры/наноканалы обеспечивают транспорт только ионов, молекул или частиц, размеры которых меньше диаметра поры/канала. Когда диаметр пор/каналов соизмерим с длиной Дебая, электростатическое взаимодействие между ионами или заряженными молекулами в растворе и поверхностью поры/канала характеризуется сильной локализацией электрического поля в области поры. В результате положительно заряженные нанопоры/наноканалы предпочтительно переносят анионы, а не катионы (рисунок 1.2), тогда как отрицательно заряженные нанопоры/наноканалы избирательно переносят катионы [117]. Исходя из разницы полярности молекул, гидрофильные нанопоры/наноканалы обеспечивают транспорт полярных молекулы быстрее, чем неполярные молекулы, тогда как в гидрофобных нанопорах/наноканалах наоборот транслокации неполярных молекулы быстрее, чем полярных молекул. Селективность заряженных нанопор/наноканалов можно дополнительно повысить, уменьшив диаметр поры/канала.

Селективность нанопор/наноканалов может быть обратимо переключена между катионо-селективностью и анионо-селективностью путем модификации поверхности амфотерными молекулами или поочередной модификации пор и

каналов противоположно заряженными полимерными цепями. Нанопоры и наноканалы, функционализированные рецепторами, включая антитела и лиганды, могут демонстрировать селективные молекулярные функции распознавания лекарств, белков, ДНК и аминокислот [113].

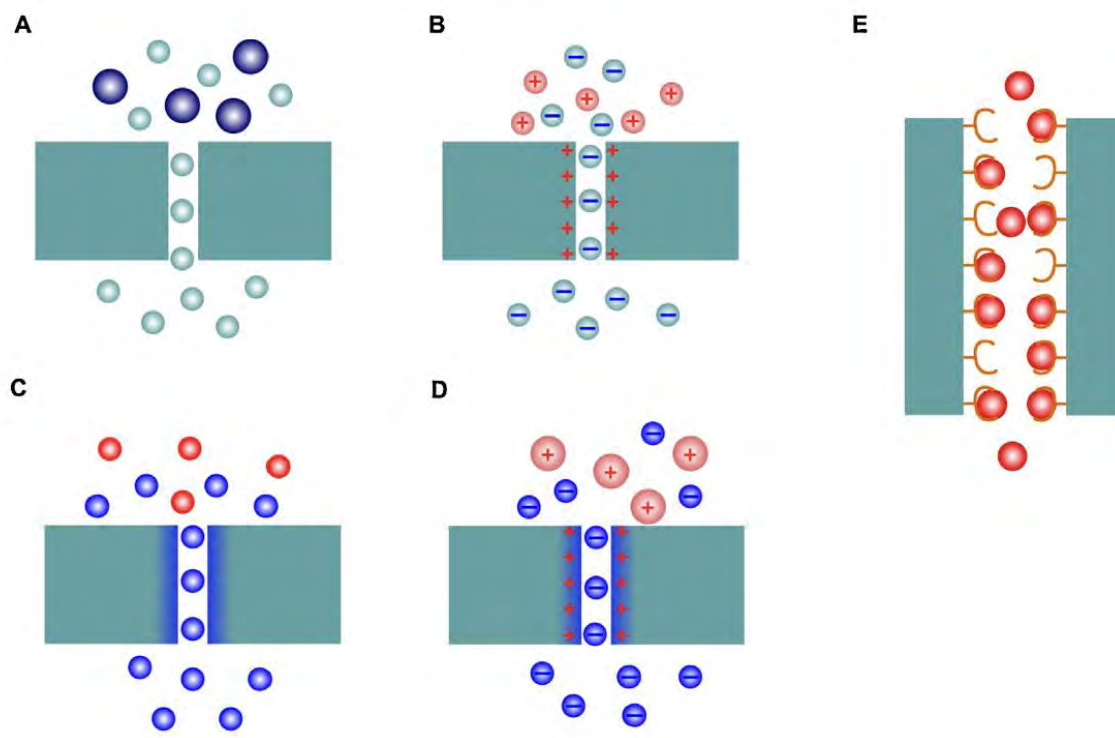


Рисунок 1.2 – Схематическое изображение селективности твердотельных нанопор и наноканалов обусловленной размером, зарядом и смачиваемостью: А. Пора/канал селективно переносит молекулы с размером, меньшим, чем диаметр поры/канала; В. Положительно заряженная пора/канал обеспечивает транспорт ионам или отрицательно заряженным молекулам; С. Гидрофильная пора/канал селективно пропускает полярные молекулы; D. Пора/канал с малым диаметром, поверхностным зарядом и полярностью демонстрирует повышение ее селективности; Е. Пора/канал, модифицированная селективными участками, демонстрирует высокую селективность целевой молекулы. [113]

Для понимания эффекта селективности нанопор важным является возникновение двойного электрического слоя (ДЭС) на стенках канала. Уравнение Пуассона–Больцмана может быть использовано для описания распределения ко-

ионов, противоионов и электрических потенциалов внутри нанопоры. С его помощью можно показать, что, как электрический потенциал, так и концентрация ионов значительно изменяются в области нескольких нанометров вокруг стенки канала, оставаясь примерно неизменными вблизи центра канала, тем самым образуя ДЭС толщиной, определяемой длиной Дебая λ_D на границе раздела стенка-электролит. В случае малых концентраций соли в электролите ДЭС перекрывается внутри поры. В таком случае экранирование заряда не происходит, при переносе начинают доминировать поверхностные эффекты. В случае высоких концентраций ДЭС становится довольно малым и перенос практически не подвержен влиянию поверхностных зарядов [118].

Более выраженная ионная селективность возникает в порах с меньшим диаметром, более плотным поверхностным зарядом и низкой концентрацией соли. При использовании нанопор меньшего диаметра удельная проводимость постепенно увеличивается с уменьшением диаметра поры, в то время как насыщение электрического тока начинает наблюдаться при более высоких концентрациях соли.

Расчет двойного электрического слоя

Двойной электрический слой появляется на границе раздела твердое тело – жидкость и может быть представлен как два параллельных слоя распределения ионов на поверхности. Схематическое изображение ДЭС показано на рисунке 1.3.

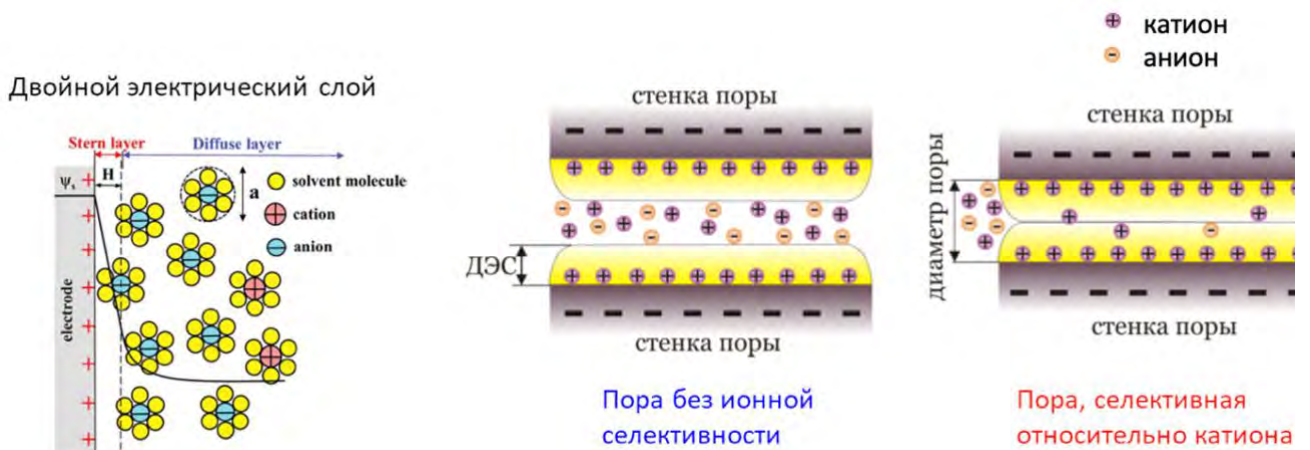


Рисунок 1.3 – Схематическое изображение ДЭС и селективности поры

Определение ДЭС необходимо для исследования аномально высокой проводимости нанопор при низких концентрациях электролита (KCl 10^{-4} – 10^{-2} М). Оценка ширины ДЭС позволяет определить, что при низких концентрациях электролита во внутреннем объеме пор происходит перекрытие двойных электрических слоев, что ведет к появлению области повышенной концентрации заряда.

Слой Гельмгольца или адсорбционный слой, возникающий на границе раздела фаз, имеет толщину равную радиусу ионов. Диффузный слой или слой Гуи, в котором находятся противоионы, имеет толщину, которая зависит от свойств системы и может достигать больших значений. Толщину диффузного слоя определяет длина Дебая:

$$\lambda = \frac{1}{\chi} = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon RT}{2F^2 I}}, \quad (1.1)$$

где χ — параметр, характеризующий скорость убывания пространственного заряда с расстоянием;

ε_0 — диэлектрическая постоянная вакуума

ε — относительная диэлектрическая проницаемость среды

R — универсальная газовая постоянная

T — абсолютная температура

F — постоянная Фарадея

I_c — ионная сила раствора по теории Дебая-Хюккеля

Ионная сила раствора, мера интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе, определяется как

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2, \quad (1.2)$$

где c_i — молярные концентрации отдельных ионов ($\frac{\text{моль}}{\text{л}}$), z_i — заряды ионов

Для раствора KCl в котором присутствуют два вида однозарядных ионов K^+ и Cl^- ионная сила будет равна концентрации раствора

$$I_c = \frac{1}{2}(c(K^+) \cdot z^2(K^+) + c(Cl^-) \cdot z^2(Cl^-)) = \frac{1}{2}(1^2 \cdot c(KCl) + (-1^2) \cdot c(KCl)) = c(KCl) \quad (1.3)$$

Зависимость толщины ДЭС от концентрации электролита показана на рисунке 1.4.

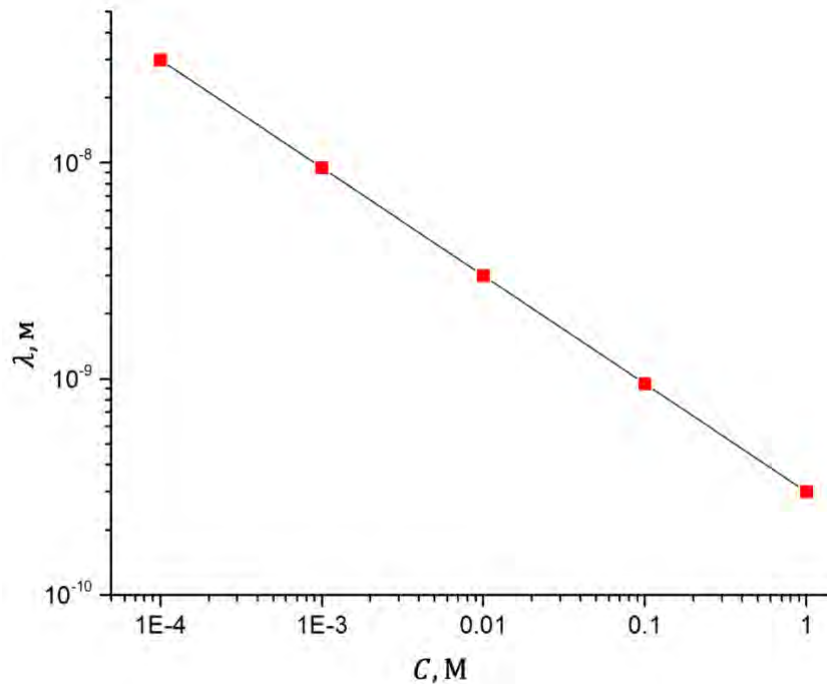


Рисунок 1.4 – Зависимость толщины ДЭС от концентрации электролита

Для малых концентраций (10^{-4} и 10^{-3}) значение толщины ДЭС может превосходить размер нанопор/наноканалов, но при повышении концентрации толщина ДЭС экспоненциально уменьшается, достигая значений 0,3 нм и 1 нм для концентрации 1М и 100 мМ, соответственно. Такое значение соответствует размерам нанопор, используемым для секвенирования [119]

Характеристики ионного транспорта

Как было отмечено ранее, ячейки для исследования транспортных характеристик нанопор обычно состоят из двух объемов, заполненных раствором электролита, разделенных тонкой диэлектрической мембраной с нанопорой. При подаче напряжения катионы и анионы под действием электрического поля перемещаются к аноду и катоду соответственно, что создает постоянный ионный

ток посредством электрохимических реакций на границе раздела электрод-жидкость.

Если упрощенно представить нанопору как цилиндр, то ее проводимость описывается как функция:

$$G = \sigma \frac{\pi d^2}{4l}, \quad (1.4)$$

где σ – объемная электропроводность раствора электролита ($10,5 \text{ См}^{-1}$ при $23 \text{ }^\circ\text{C}$), величина обратная объемному удельному сопротивлению ρ , d – диаметр круглой нанопоры, l – толщина мембраны.

Однако эта модель работает только в том случае, если диаметр нанопор меньше 15 нм, так как сопротивление доступа (R_{access}) снаружи поры, которым пренебрегают в уравнении, становится доминирующим фактором при больших диаметрах пор [90].

Понятие сопротивления доступа вытекает из следующего факта: если рассмотреть электрическое сопротивление среды между двумя сферическими электродами, погруженными в эту среду, то это сопротивление зависит не от расстояния между электродами, а от их размера. Это происходит потому, что в сопротивлении преобладает узкая область, где электрический ток приближается к электроду. Сопротивление между двумя сферическими электродами в бесконечной среде равно $4\rho/\pi d$, где d - диаметр электрода. Если предположить, что около поры находится полусферический купол, то можно описать сопротивление доступа как:

$$R_{access} = \frac{\rho}{\pi d}, \quad (1.5)$$

где d – диаметр электрода.

Но можно рассматривать область вокруг поры и как плоский диск, тогда

$$R_{access} = \frac{\rho}{2d}. \quad (1.6)$$

Нанопровую структуру можно рассматривать как плоскопараллельный конденсатор:

$$R = R_{channel} + R_{access} \quad (1.7)$$

Проводимость нанопоры рассчитывается с использованием следующего выражения [120]:

$$G = \sigma \left(\frac{4l}{\pi d_{pore}^2} + \frac{1}{d_{pore}} \right)^{-1} \quad (1.8)$$

где G – проводимость нанопоры, которая определяется по наклону вольт-амперной характеристики (ВАХ), l и d_{pore} – длина и диаметр пор соответственно.

Из формулы 1.6 можно определить диаметр нанопоры d_{pore} . Предположив, что нанопора имеет цилиндрическую геометрию, и измерив ВАХ для получения значения проводимости, эффективный диаметр нанопоры d определяется как [120]:

$$d_{pore} = \frac{G}{2\sigma} \left(1 + \sqrt{1 + \frac{16\sigma l}{\pi G}} \right). \quad (1.7)$$

Эта простая аналитическая модель способна объяснить характеристики ионного тока в нанопорах. Однако, такая оценка проводимости не подходит для низких концентраций из-за перекрытия двойного электрического слоя, возникающего на стенках нанопоры и справедлива лишь в случае высоких концентраций, когда электролит ведет себя как объемный раствор.

Так для анализа экспериментальных результатов и расчета эффективных размеров наноканалов может быть использована теория переноса ионов через наноканал, основанная на модели однородного потенциала, уравнений Навье-Стокса, Нернста-Планка и Пуассона.

Рассматривается цилиндрический наноканал радиусом R_p и длиной L_p , который разделяет два резервуара L (слева) и R (справа) с водным раствором одного и того же одновалентного и симметричного (1:1) электролита концентрации C_0 (рисунок 1.5).

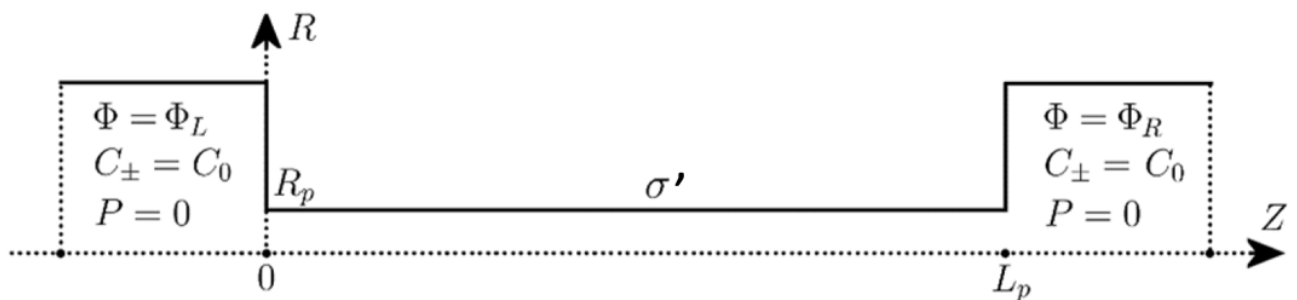


Рисунок 1.5 – Модель цилиндрического наноканала, разделяющего два резервуара

Движение ионов индуцируется электрическим полем, которое создается путем задания различных потенциалов Φ_L и Φ_R в резервуарах. Можно предположить, не теряя общности, что потенциал в левом резервуаре равен нулю.

В резервуарах поддерживается одинаковое постоянное давление (P), которое для простоты принимается равным нулю. Поверхность наноканала заряжена, а поверхностная плотность заряда обозначается через σ' . Далее, предполагается, что электрический потенциал Φ , концентрации ионов C^\pm и давление P одинаковы в каждом поперечном сечении поры, поэтому они являются функциями координаты z , направленной вдоль поры. Это предположение справедливо, когда радиус пор сравним или меньше Дебаевской длины, которая определяется по формуле (1.1).

Основные уравнения для электрического потенциала, концентраций ионов и давления интегрируются вдоль нанопоры с соответствующими граничными условиями на входе и выходе из поры (скачки потенциала и концентраций ионов по Доннану и соответствующие скачки осмотического давления). Это позволяет определить объемный поток (скорость) u_a раствора, потоки ионов J^\pm , общий поток ионов $J = J^+ + J^-$ и поток ионного заряда $I' = J^+ - J^-$. Последний связан с ионным током формулой $I = \pi R_p^2 F I'$, где F – постоянная Фарадея.

Ионная проводимость G – это отношение ионного тока I к приложенной разности потенциалов U :

$$G = \frac{I}{U} \quad (1.8)$$

где $U = \Phi_L - \Phi_R$, таким образом, положительное падение напряжения между левым и правым резервуарами индуцирует положительный ток, т.е. положительный заряд переносится в направлении электрического поля. Удельная проводимость (См/м) цилиндрического наноканала определяется как

$$k = G \frac{L_p}{\pi R_p^2}, \quad (1.9)$$

Следует отметить, что, если радиус поры больше длины Дебая, предположение об однородности потенциала и концентраций ионов в поперечном сечении поры не действует. Однако, увеличение радиуса поры снижает

эффективный объемный заряд, таким образом, размерные эффекты пор все еще могут быть описаны представленной моделью с постоянным потенциалом.

Аппроксимация экспериментальных данных теоретической моделью выполняется путем минимизации суммы квадратов ошибок между теоретическими и экспериментальными точками. Для однопараметрической аппроксимации используется метод золотого сечения, а для многопараметрической аппроксимации - метод Нелдера-Мида.

Детальное описание модели можно найти в [121].

1.4 Способы управления транспортом биомолекул в микро- и наноструктурах

Перемещение фрагментов ДНК в наноразмерных структурах можно осуществлять путём приложения различных движущих сил к целевым молекулам, находящемуся в рабочем растворе.

Основные способы управления движением микро- и нанообъектов:

- Электрические поля (однородное, неоднородное)
- Градиент концентрации
- Градиент давления (силовые поля: давление, разряжение, центробежные силы)
- Оптическое воздействие (электромагнитные поля)
- Магнитофорез – необходима соответствующая модификация поверхности объекта.

Явление электрофореза – это движение заряженных частиц, взвешенных в растворах электролитов в ответ на внешнее приложенное электрическое поле [122]. Например, электрофорез в геле давно применяется для разделения смеси заряженных частиц или молекул [123]. С помощью электрофоретических методов в микро- и нанофлюидных устройствах можно разделять и растягивать молекулы ДНК, определять размеры наночастиц [124].

Нанопоры представляют собой наноразмерные отверстия, сделанные в непроницаемой мембране, разделяющей два резервуара с электролитом. Поскольку

практически все нуклеиновые кислоты и белки несут собственный электрический заряд, электрическое поле может использоваться для перемещения молекул к отверстию нанометрового размера в тонкой мембране или пленке и через него. Когда диаметр нанопоры больше поперечного сечения анализируемого вещества, молекула подводится к входу в пору и перемещается через нее, обеспечивая продвижение всей молекулы по мере ее прохождения через пору. Для этого по разные стороны мембраны подается соответствующее напряжение смещения, молекула перемещается из одной камеры (*cis-*) в другую (*trans-*), блокируя часть ионного тока, протекающего через пору, позволяя проводить прямое резистивное зондирование анализируемых молекул.

Перенос анализируемого вещества в нанопорах обычно происходит посредством механизмов электрофореза, электроосмоса, диэлектрофореза или диффузии [125]. Поверхностные заряды нанопор и молекулы играют важную роль в электрофорезе и транспорте, управляемом электроосмосом [126]. В зависимости от поверхностного заряда нанопоры и молекул/ионов, электрофоретические и электроосмотические силы ($F_{ЭФ}$ и $F_{ЭО}$ соответственно) могут быть противоположными или одинаково направленными [127].

Электрофорез является наиболее изученным эффектом используемым для детектирования ДНК с помощью нанопор. Помимо этого, электрофорез также используется в экспериментах с участием пептидов, белков или белковых агрегатов (которые, как правило, несут относительно небольшой заряд) и наночастиц, которые при погружении в растворы электролитов обычно приобретают поверхностный заряд. В результате приложения напряжения к мембране с одиночной нанопорой возникает электрическое поле, а поскольку твердотельные нанопористые мембраны, имеют низкую диэлектрическую проницаемость по сравнению с диэлектрической проницаемостью раствора электролита ($\epsilon \approx 80$ для воды) электрическое поле проникает внутрь поры. Следовательно, заряженные молекулы при приложенном напряжении двигаются к поре или от нее, в зависимости от знака их заряда. Единственными конкурирующими эффектами такого переноса являются броуновская диффузия и преодоление барьера

свободной энергии на входе в поры, причем последнее особенно актуально для молекул (например, фрагментов однонитевой ДНК), захват которых в порах происходит только за счет значительного снижения энтропии.

Захват наночастиц или биомолекул может быть вызван адвекцией. В этом случае поток жидкости, направленный к поре, увлекает диспергированные в растворе частицы независимо от их заряда. Поток может создаваться за счет разности давлений между двумя сторонами мембраны или за счет электроосмоса. Поскольку поверхность нанопоры обычно заряжена, поверхностный заряд вызывает накопление противоионов и истощение ко-ионов внутри пор. Как следствие, когда напряжение прикладывается с двух сторон от мембраны, дисбаланс между положительным и отрицательным зарядами внутри пор приводит к возникновению результирующей силы, действующей на раствор, которая перемещает жидкость. Таким образом, электроосмос тесно связан с ионным потоком, поскольку оба они зависят от формы пор и распределения их заряда, что приводит к сложным электрогидродинамическим явлениям.

Электрофорез в значительной степени определяется зарядом анализируемого объекта, который зависит от значения рН, а также приложенным напряжением. В свою очередь, электроосмос обусловлен поверхностным зарядом нанопор, который также зависит от рН, природы и концентрации электролита и приложенного напряжения. Поверхностный заряд нанопор, в силу ограниченного объема, подвержен влиянию различных факторов, включая метод их изготовления [128]. Для нейтральных по заряду молекул электроосмос необходим для их движения в растворе. Кроме того, в случае заряженных частиц электроосмос может захватывать частицы и перемещать их против электрофореза. Ключевыми факторами являются свойства поверхности нанопор для электроосмоса и заряд частиц для электрофореза, которые в свою очередь зависят от рН раствора. Концентрация электролита также играет важную роль в механизме электроосмотического переноса [129].

Например, при более высоких концентрациях электролита ДЭС, который вносит наибольший вклад в доминирующем электроосмотическом механизме

переноса, будет более компактным, и наоборот - при более низких концентрациях. Концентрация электролита влияет на природу поверхностного заряда, таким образом если влияние поверхности не учитывается должным образом, это может приводить к расхождению между ожидаемой проводимостью открытых пор и фактическими значениями при низких концентрациях электролита.

Так, варьируя концентрацию электролита, можно регулировать величину вклада электроосмоса в общий перенос и, следовательно, скорость движения молекул в зависимости от того, противодействует ли $F_{ЭО}$ или усиливает $F_{ЭФ}$. Электроосмос может быть сведен к минимуму за счет модификации поверхности нанопор, при которой поверхность остается нейтральной по заряду в диапазоне определенных значений рН [130].

При использовании контролируемого диэлектрического пробоя для изготовления пор изменение химического состава электролита позволяет получать нанопоры со значительно отличающимся химическим составом поверхности по сравнению с обычными нанопорами. Плотность поверхностного заряда таких химически модифицированных нанопор существенно не изменяется до рН~8 [131]. Поскольку поверхностный заряд нанопоры при рН~8 отрицателен, для отрицательно заряженного анализируемого вещества, если $F_{ЭФ} > F_{ЭО}$, перемещение будет происходить при положительной полярности напряжения и при противоположной полярности, если $F_{ЭО} > F_{ЭФ}$.

Когда наночастицы или молекулы подходят к нанопоре всего на несколько атомных длин, на их динамику начинают влиять химические взаимодействия между частицами и порой. Эти взаимодействия, сильно зависящие от специфической природы частиц, могут быть использованы для захвата и удержания частицы в нанопоре, а также совершенного события транслокации.

Захват фрагментов ДНК нанопорой

Каждый этап захват отдельной молекулы в нанопоре определяется броуновской диффузией в растворе, распределением потоков жидкости и электрического потенциала, а также химическим взаимодействием молекулы с

поверхностью нанопоры. В частности, напряженность электрического поля и скорость потока раствора, вызванные электроосмосом или градиентом давления, уменьшаются с увеличением расстояния между молекулой и входом в пору, тогда как химические взаимодействия имеют значение только тогда, когда молекула и пора практически соприкасаются.

Можно выделить три основных стадии захвата фрагментов однонитевой ДНК или частицы (рисунок 1.6):

1. Объемная диффузия (bulk diffusion): вдали от поры электрофорез незначителен, преобладает броуновское движение частицы в объеме (рисунок 1.6 i).

2. Засасывание (funneling): броуновское движение подводит молекулы в область захвата пор. В этот момент над броуновской диффузией начинает преобладать электрические и гидродинамические силы. Если предполагать, что последние направлены во внутрь поры, молекула испытывает эффективное воронкообразное силовое поле, для которого характерно, что чем ближе частица находится к поре, тем больше сила притяжения (рисунок 1.6 ii).

3. Стыковка с порой (pore docking) происходит, когда частица достигает области входа в пору, где химические взаимодействия между порой и частицами становятся доминирующими. При этом, частица должна преодолеть барьер свободной энергии ΔG , чтобы произошла транслокация (рисунок 1.6 iii).

В статьях упоминается несколько теоретических подходов к описанию захвата наночастиц или молекул [101,125,132]. Первые две стадии обычно пытаются описать механизм захвата с помощью обобщенного уравнения Смолуховского. В этом случае, частица моделируется как материальная точка, находящаяся под действием внешнего воздействия вблизи поры (например, электрофореза) и броуновской диффузии. Третья стадия может быть описана с использованием двух разных подходов. В первом случае, когда рассматривается большая пора с диаметром, в несколько раз превышающим толщину однонитевой ДНК, потенциальный барьер выступает в качестве дополнительной силы влияющей на распределение диффузионных и дрейфовых потоков. Для описания

этого режима достаточно решить уравнение Смолуховского как для первых двух стадий.

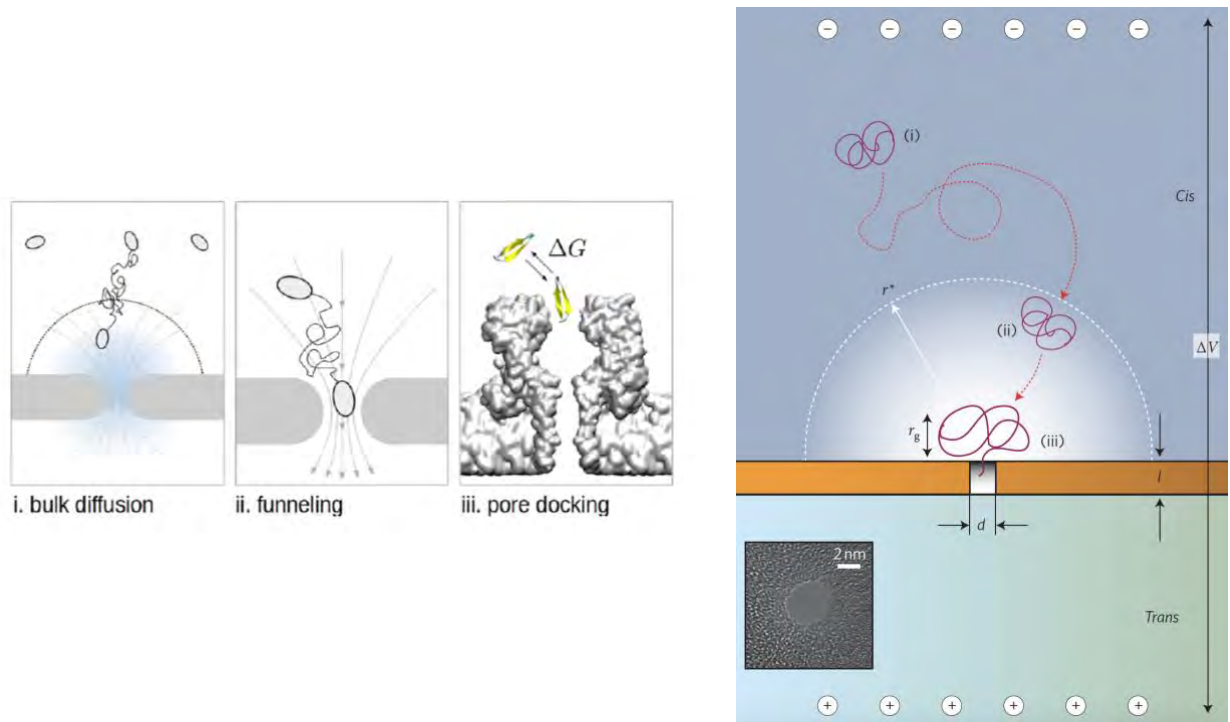


Рисунок 1.6 – Модели стадий захвата фрагментов ДНК нанопорой [101,125]

Второй подход описывает более сложный механизм и справедлив для малых пор < 5 нм. Как только спираль ДНК оказывается в пределах примерно одного размера молекулы (r_g) от поры, конец ДНК проникает в пору, и этот процесс включает в себя преодоление барьера свободной энергии. ДНК пройдет через пору только тогда, когда гидродинамические силы сопротивления преодолят энтропийные силы удержания. Вблизи порогового значения высота барьера составляет порядка $k_B T$, а переход между двумя состояниями происходит из-за тепловых флуктуаций системы. В таком случае частота транслокаций описывается с помощью статистической физики, а именно с использованием закона Аррениуса. В этом случае частице или ДНК нужно преодолеть энергетический барьер чтобы произошла транслокация.

Частота транслокаций описывается уравнением

$$f_{DNA} = K e^{-\frac{\Delta F}{k_B T}}, \quad (1.10)$$

где ΔF – потенциальный барьер.

В работе [132] рассмотрен случай, когда движение молекул происходит за счет разницы давлений в отсутствие электрического поля. Частота событий определяется с помощью префактора K – частота соприкосновений или подхода ДНК к нанопоре за единицу времени. Важно понимать, что не каждое соприкосновение молекулы с порой приводит к транслокации. Вероятность того, что это произойдет определяется термодинамической экспонентой, где ΔF это потенциальный барьер, который необходимо преодолеть ДНК чтобы пройти сквозь пору. $k_B T$ указывает на флуктуации энергии, поэтому можно сказать, что чем выше температура системы, тем вероятнее будут происходить транслокации. Сам префактор K определяется потоком, чем выше поток, тем больше ДНК будут подходить к нанопоре, тем чаще будут происходить события. В работе [132] показано, что активация транслокаций имеет пороговый характер.

В работе [101] потенциальный барьер описан аналогично, но с учетом приложенного напряжения. Частота транслокаций также описывается формулой Аррениуса с учетом приложенного напряжения. Учитывается влияние концентрации раствора и распределение электростатического потенциала поры на механику захвата ДНК в приграничной области поры и на частоту соприкосновений ДНК с порой. Оценка потенциального барьера недостаточна для определения частоты транслокаций, на нее также влияет частота захвата ДНК. Этот параметр может зависеть от пространственного распределения потенциала поры и температуры. Потенциальный барьер возникает из-за изменений в электростатическом взаимодействии между участками ДНК, распределении ионных облаков и молекул раствора, а также конформационной энтропии ДНК. Степень ионизации, сила электростатического взаимодействия, снижение концентрации солевого раствора и качества раствора – все это может приводить к повышению барьера.

В работе [133] было изучено поведение белка стрептавидина, проходящего через твердотельные нанопоры с диаметром, превышающим их длину, что отличается от процессов транслокации, в которых доминирует электроосмотический поток (ЭОП). Наблюдалось, что чрезмерно высокая скорость

транслокации белков через пору приводит к тому, что большинство событий остаются незамеченными. Экспериментальные результаты показали тенденцию к увеличению скорости прохождения стрептоведина для нанопор с небольшим диаметром, а максимальная скорость стрептавидина примерно в 17 раз больше, чем сообщалось в других работах [134]. Численное моделирование показало, что повышенная частота возникает из-за ЭОП параболической формы в нанопоре, которая обеспечивает область с низкой скоростью раствора, что позволяет обнаруживать молекулы стрептавидина, движущиеся достаточно медленно. Однако по мере увеличения диаметра поры максимальная обнаруживаемая скорость белка уменьшается из-за снижения отношения сигнал/шум. Также обнаружено, что скорость прохождения белка медленно увеличивается с амплитудой напряжений, а затем снижается при пороговом смещении. Это явление можно объяснить ограничением полосы пропускания в сочетании с нелинейной зависимостью скорости ЭОП в центральной области пор от приложенного напряжения.

В работе [135] описан массив твердотельных нанопор размерами около 200 нм с электрическим затвором в качестве нанофлюидных транзисторов для управления захватом и прохождением ДНК. Такие устройства способны обратимо изменять скорость прохождения ДНК более чем на 3 порядка, используя смещение электрода затвора менее 1 В. Регулируя размеры нанотранзистора, свойства его поверхности, концентрацию соли и pH и изменяя напряжение затвора для модуляции формы ДЭС можно изменять ЭОП, противодействующей электрофоретическому движению ДНК. Эффективное перемещение ДНК происходит благодаря уравниванию этих противоположных потоков.

Помимо генерации потоков приложенным электрическим полем, интерес могут представлять и потоки, вызванные разностью давлений. Так, в работе [136] показано, что индуцируются два встречно-направленных потока раствора KCl: электроосмотический поток, и поток, вызванный приложением избыточного давления. Управление давлением и электроосмотическим потоком позволяет получить область отрицательного сопротивления, а также устойчивые состояния с

высокой и низкой проводимостью электролита. Лабораторная установка данного эксперимента представляет собой два микрообъёма, соединённых стеклянной нанопорой диаметром 200-500 нм. Объёмы заполнены раствором KCl с разной концентрацией. В объёме с большей концентрацией электролита, с помощью насоса создаётся избыточное давление, в результате чего возникает индуцированный давлением поток, направленный в объём с меньшей концентрацией. При приложении отрицательной разности потенциалов к электродам, возникает электроосмотический поток, направленный в противоположную сторону. При малых приложенных напряжениях, в устройстве доминирует поток, вызванный давлением, а система находится в состоянии высокой проводимости. При увеличении напряжения, скорости встречных потоков выравниваются, и концентрация ионов в области поры падает. Это приводит к тому, что в узком диапазоне напряжений система переходит в состояние с низкой проводимостью, а на вольтамперной характеристике возникает участок отрицательного сопротивления. Также выяснено что напряжение перехода между состояниями с высокой и низкой проводимостью зависит от плотности поверхностного заряда электролита.

Транспортные свойства наноструктур могут дополнительно изменяться при функционализации поверхности. В работе [137] исследуются транспортные свойства нанопор, в которых стенки модифицированы массивом полимерных щетинок. Нанопоры синтезировались в ультратонких золотых плёнках, после чего на их стенки высаживались щетинки из полиэтиленгликоля. Высаженные щетинки образуют кинетический барьер, который препятствует прохождению через пору белков, однако не мешает протеканию воды и прохождению малых по размеру молекул. При добавлении в раствор антител IgG происходит их связывание с полимерными щетинками, в результате чего кинетический барьер исчезает и белки снова могут проходить через пору. Поскольку антитела способны диссоциировать, процесс открытия и закрытия поры является обратимым. Получаемые таким образом структуры селективного транспорта могут использоваться в

биомолекулярных фильтрах, а также в системах транспорта, имитирующих биологические системы.

Еще одним перспективным подходом для управления транспортными свойствами биомолекул в микро- и наноканальных системах является применение оптического излучения в качестве управляемого сигнала. Такой подход достаточно подробно описан в литературе, например в работах [47,138]. Однако, как правило, для реализации фотоиндуцированного изменения транспортных свойств применяются полимерные мембраны. В данном случае транспортные свойства изменяются благодаря фотохимическим реакциям на поверхности мембраны. В результате этих реакций на поверхности мембраны образуются новые активные группы и селективные свойства изменяются.

Также в числе инструментов для управления транспортными свойствами необходимо отметить плазмонные структуры. Использование плазмонных структур не ограничивается оптической спектроскопией, позволяющей детектировать проходящие через наноструктуру вещества с точностью до отдельных молекул. Например, плазмонный резонанс в нанопорах [139] позволяет реализовывать локальный контроль температуры, направлять молекулы к необходимым участкам посредством термофореза, а также производить захват объектов. Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) относится к коллективным колебаниям электронов проводимости в металлических наноструктурах. Как интенсивность, так и энергия ППР сильно зависят от размера, формы и материала наноструктур, а также от диэлектрических свойств окружающей среды. На отклик плазмонного датчика влияют различные факторы, которые позволяют проектировать плазмонные датчики с настраиваемой чувствительностью.

Таким образом, комбинация транспортных свойств наноканалов и частиц, обладающих плазмонным резонансом, имеет большой потенциал для применения в создании новых устройств. В частности, в работе [51] авторы демонстрируют плазмонный сенсор, основанный на протекании раствора аналита через нанопору в золотой мембране.

Ещё одним методом увеличения селективности наноструктур является создание теплового градиента в растворе электролита [140]. В данной работе через массив нанопор диаметром (50-130 нм) пропускаются молекулы ДНК. Локальный нагрев пространства перед порами достигается за счет лазерного излучения. Показано, что при наличии термофореза возле поры, скорость захвата молекул ДНК уменьшается с увеличением их длины. Комбинируя величину нагрева и приложенное к поре напряжение, можно достичь полной остановки прохождения через поры молекул большой длины. Это позволяет создать высокопроизводительное устройство для детектирования и сортировки молекулярных соединений.

Еще один способ управления молекулами и частицами является магнитофорез, явление, при котором частицы перемещаются в магнитном поле. Магнитофорез можно классифицировать как положительный и отрицательный. Положительный – это миграция магнитных частиц в диамагнитной среде, отрицательный – это миграция диамагнитных частиц в магнитной среде. Магнитофорез происходит при градиенте магнитного поля, градиенте намагниченности окружающей среды или комбинации того и другого [141]. Например, можно использовать магнитные частицы, покрытые стрептавидином для загрузки ДНК/РНК в наноколодцы [142], но остается вопросом извлечение использованных магнитных частиц из ячейки.

Также к методам управления транспортом биологических молекул в наноустройствах можно отнести оптический захват [143]. Однако, оптические методы используют энергию фотонов для перемещения частиц, тепло, выделяемое сфокусированным лазерным лучом, может негативно повлиять на молекулы, а оптическая установка для многоканальной системы является сложной и дорогостоящей.

1.5 Особенности экспериментальных исследований с использованием наноразмерных устройств

Основными проблемами при исследовании транспорта ионов и молекул через наноразмерные структуры являются возникновение пузырей газа в области мембраны во время измерений, низкое соотношение сигнал/шум, а также сложность обработки полученных сигналов для определения достоверных событий транслокации. В данном разделе рассматриваются причины возникновения, а также способы преодоления перечисленных трудностей.

Предотвращение нуклеации пузырьков газа в микро- и нанофлюидных системах

Пузырьки газа являются основной проблемой в микро- и нанофлюидике, приводя к ошибкам в измерениях и нарушению в движении потока жидкости. Образование пузырей может быть вызвано различными причинами, например, наличием растворенных газовых примесей в жидкости, изменением давления или температуры, электрохимическими процессами, а также свойствами поверхности микро- и нанофлюидного устройства.

Любая жидкость, находящаяся в равновесии с газовой фазой, содержит молекулы газа в своем объеме. Так, обычные реагенты, используемые в лаборатории, содержат определенную концентрацию (c) молекул воздуха (в основном N_2 и O_2). Равновесная концентрация этих газовых частиц (c_s) в жидком растворе (масса или моли газа на объем жидкости) задается законом Генри:

$c_s = H(T)p_g$, где p_g - давление газа в паровой фазе и $H(T)$ - константа растворимости по закону Генри, различная для каждого вида газа и снижающаяся с повышением температуры и в меньшей степени зависящая от ионной силы и растворенных органических соединений. Когда жидкость находится в равновесии ($c = c_s$), говорят, что она находится в насыщенном состоянии [144].

Используется несколько подходов, направленных на предотвращение образования газовых пузырей. Один из способов повысить смачиваемость микрофлюидного устройства – это нанесение гидрофобных покрытий на

поверхность материала. Обработка позволяет создать стабильную гидрофобную поверхность, которая отталкивает жидкость и предотвращает образование газовых пузырей. Также могут быть использованы самоорганизующиеся молекулы, которые формируют гидрофобные структуры на поверхности материала без необходимости нанесения покрытий.

Специальные покрытия или обработка поверхности уменьшают поверхностное натяжение. В микрофлюидных системах, где размеры каналов и объемы жидкости очень малы, поверхностное натяжение может стать причиной образования газовых пузырей, что может негативно сказаться на работе системы. Один из методов обработки поверхности, который может помочь уменьшить поверхностное натяжение – это использование поверхностно-активных веществ (ПАВ). Альтернативный метод обработки — это модификация поверхности с помощью плазмы. При помощи плазмы можно изменить поверхностные свойства материала, такие как гидрофильность или гидрофобность, что может помочь уменьшить поверхностное натяжение. Помимо этого, для модификации поверхности и предотвращения образования газовых пузырей можно использовать супергидрофобные покрытия или микроструктурирование поверхности [144].

Также, важным является контроль давления и температуры в системе. Так, высокое давление может способствовать растворению газа в жидкости, что приводит к образованию пузырей при снижении давления, поэтому для обеспечения нормального потока жидкости необходимо поддерживать стабильное и оптимальное давление, а при повышенной температуре газ может легче выделяться из жидкости и образовывать пузыри. Существуют различные методы для регулирования давления и температуры, например, использование микроклапанов и микронасадок может помочь контролировать давление, а термостатические камеры или нагревательные элементы обеспечивают стабильную температуру.

Помимо этого, использование разряжения/вакуума может помочь в удалении газовых пузырей из системы. При разрежении газовые пузыри собираются на

поверхности и затем удаляются. Вакуум также применяется для дегазации растворов перед экспериментом для уменьшения вероятности нуклеации пузырей.

Образованию воздушных пробок на поверхностях могут способствовать геометрические особенности устройства, такие как острые углы или шероховатость поверхности, особенно при первоначальном заполнении системы в сухом состоянии. Прямое попадание воздуха внутрь системы может быть результатом несовершенной герметизации стыков, что устраняется путем обеспечения герметичных соединений с надлежащей фиксацией разъемов и/или использованием заполняющего материала (например, полимеров, клея или смолы).

Перечисленные методы помогают поддерживать стабильный поток жидкости и предотвращать ошибки, связанные с образованием газовых пузырей в микро- и нанофлюидных системах.

Соотношение сигнал/шум

Механизм детектирования молекул происходит за счет детектирования электрического сигнала при прохождении молекулы через поры. Электрическое детектирование осуществляется усилителем, который распознает и усиливает текущий сигнал, а затем цифровым преобразователем, который выполняет аналого-цифровое преобразование данных. Цифровая фильтрация нижних частот (low-pass, LP) обычно используется для уменьшения высокочастотного шума и, таким образом, улучшения отношения сигнал/шум (signal-to-noise, SNR).

Обнаружение молекул с помощью нанопор с одной стороны ограничено шумом ионного тока, который требует фильтрации нижних частот, устанавливающей конечную рабочую полосу пропускания, а с другой стороны высокой скоростью (обычно менее миллисекунд), с которой молекулы перемещаются через поры. Для замедления транслокации были предприняты различные попытки увеличить временное разрешение с помощью модификации поверхности, использовании разных электролитов или оптического захвата [145].

Шум можно охарактеризовать стандартным отклонением σ или среднеквадратичным отклонением от среднего значения, измеренного по всей

полосе пропускания сигнала и его спектральной плотностью мощности. Как правило, шум нежелателен, так как он может исказить или даже полностью замаскировать реальный сигнал. На рисунке 1.7 показан пример соотношения шума к сигналу ионного тока для твердотельной нанопоры SiN_x и биологической $\alpha\text{-HL}$.

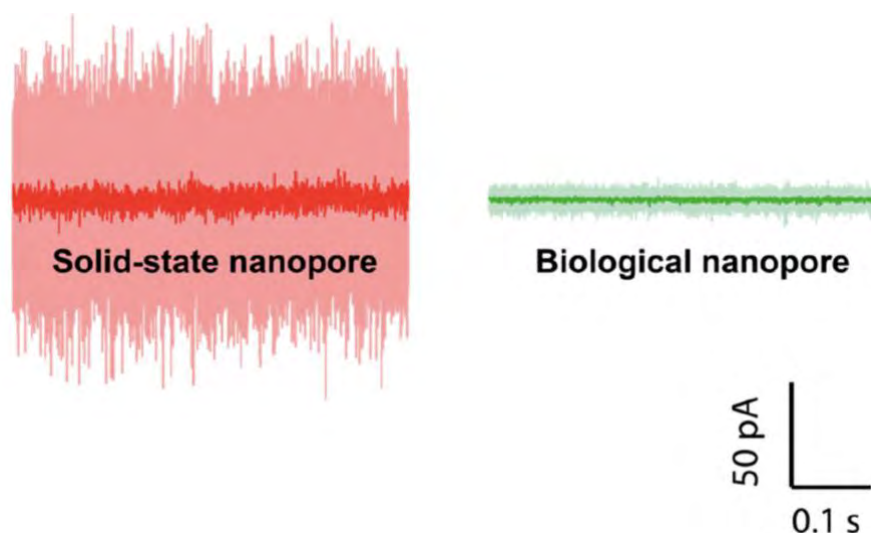


Рисунок 1.7 – Пример соотношения шума к сигналу ионного тока для твердотельной нанопоры SiN_x диаметром 1,3 нм (красный) и биологической поры $\alpha\text{-HL}$ диаметром 1,4 нм (зеленый) при приложении напряжения смещения 100 мВ в 1 М КСl буфере [145]

Несмотря на то, что было продемонстрировано детектирование отдельных участков последовательности ДНК, соотношение сигнал/шум все еще не позволяет воспроизводимо реализовать секвенирование ДНК с помощью твердотельных нанопор. Ключевым моментом является понимание природы возникновения шума и изучение возможностей для оптимизации информативного сигнала.

Источники шума для нанопоровых структур можно разделить на низкочастотный ($\approx 100\text{-}700$ Гц) шум $1/f$, дробовой шум и шум теплового тока ($\approx 0,1\text{-}2$ кГц), которые являются источниками белого шума (т.е. не зависят от частоты), высокочастотный диэлектрический ($\approx 1\text{-}10$ кГц) и емкостной (>10 кГц) шум.

Составляющие электрического шума могут быть описаны следующим уравнением [146]:

$$S(f) = a \frac{I^2}{f} + b \frac{kT}{R+r} + ckTDCf + dv^2C^2f^2, \quad (1.11)$$

где $S(f)$ – спектр мощности (квадрат величины преобразования Фурье тока в открытых порах в зависимости от частоты f), I – средний ток в открытых порах, kT – температура Больцмана, R – объемное сопротивление нанопор, r – сопротивление доступа, D это постоянная диэлектрических потерь мембраны, C – емкость мембраны, v – среднеквадратичное значение шума напряжения на входе, a , b , c и d – предварительные факторы, которые определяют относительную силу каждого вклада и варьируются в зависимости от нанопор и конфигурации образца. Рисунок 1.8 показывает все составляющие электрического шума на зависимости спектральной мощности от частоты.

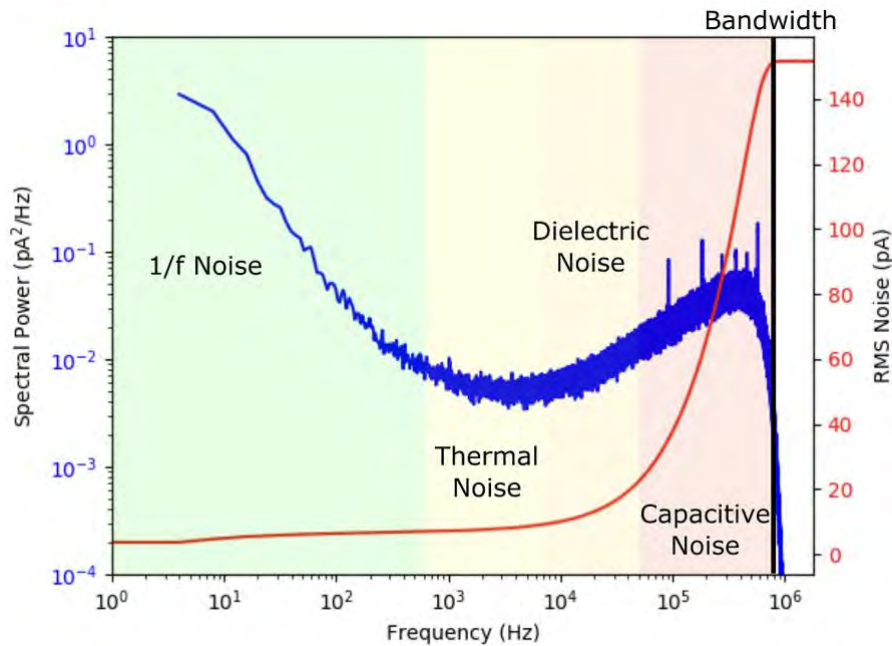


Рисунок 1.8 – Зависимость спектральной мощности от частоты.

Составляющие компоненты электрического шума в нанопоре: низкочастотный шум $1/f$, тепловой шум, диэлектрический и емкостной шумы [146]

Характерной особенностью твердотельных нанопор является выраженный низкочастотный шум $1/f$. Он является наиболее важным для оценки качества нанопор и может быть вызван целым рядом физических процессов. На рисунке 1.8 он выделен зеленым цветом. Несмотря на то, что эта часть спектра вносит

относительно небольшой вклад в общий шум при высокой пропускной способности, она является основным фактором, определяющим, сможет ли нанопора использоваться для детектирования биомолекулы. Часто бывает так, что поры с большим $1/f$ компонентом просто не пропускают биомолекулы.

Вторым членом уравнения 1.11 является тепловой шум. При комнатной температуре для малых пор его эффект незначителен, но для пор большего размера может играть существенную роль. На рисунке 1.8 этот шум находится в желтой области. Диэлектрический шум зависит от конструкции мембраны и ее емкости, линейно изменяясь в зависимости от частоты.

Емкостной шум квадратично изменяется в зависимости от частоты и является основным вкладом в общий среднеквадратичный шум нанопоры. Эта часть спектра мощности не зависит от характеристик самой нанопоры, поэтому любая необходимая оптимизация высокочастотного режима должна происходить на уровне конструкции мембраны.

В работе [147] показали, что плохая смачиваемость поверхности пор, связанная с образованием пузырьков, приводит к высокому уровню шума в SiN_x нанопорах. В [148] отмечено, что высокий уровень шума в порах SiN_x коррелирует с загрязнением поверхности: неоднородности поверхности пор приводят к флуктуациям количества и подвижности носителей заряда из-за захвата на поверхности пор, аналогично шуму в полупроводниках.

Как показано [149] мощность низкочастотного шума в SiN_x нанопорах обратно пропорциональна количеству носителей заряда, присутствующих в объеме нанопор. Что касается высокочастотного шума, то в твердотельных нанопорах преобладают диэлектрические ($\approx 2-10$ кГц) и емкостные помехи (>10 кГц). Уровень шума от этих источников в основном зависит от емкости образца, которая, в свою очередь, определяется размером мембраны и подложки, толщиной и диэлектрической проницаемостью. Кроме того, паразитные емкости усилителя тоже могут влиять на уровень шума.

Низкочастотный шум может быть эффективно подавлен за счет функционализации поверхности нанопор SiN_x гидрофильным поверхностным

слоем, таким как Al_2O_3 или SiO_2 . В принципе, любая обработка поверхности, которая уменьшает количество загрязняющих веществ и улучшает гидрофильность поверхности пор, снижает уровень шума [150]. В работе [148] показали, что обработка раствором «пираньи» (30% H_2O_2/H_2SO_4 , 1:3 объемных долей) снижает уровень шума на 3 порядка. В [151] продемонстрировали, что циклическое воздействие сильных электрических полей на нанопору может успешно подавлять источник шума. Помимо этого, шум можно свести к минимуму, выбрав значение pH, которое находится далеко от изоэлектрической точки нанопористого материала (≈ 5 для Si_3N_4).

Методы для максимального повышения чувствительности твердотельной нанопоры могут быть направлены либо на дальнейшее повышение временного разрешения, например, за счет еще большего снижения общей паразитной емкости, либо за счет создания эффективного механизма замедления. Понимание источников шума может существенно расширить диапазон применения устройств на основе твердотельных нанопор.

Идентификация событий транслокаций

Помимо оптимизации условий эксперимента и методов детектирования, решающее значение имеет обработка полученных сигналов и определение события транслокации. Перемещение молекулы ДНК через нанопору приводит к резкому скачкообразному изменению (пикам) амплитуды измеряемого тока. Это явление называется событие транслокации. События, как правило, распределяются в необработанном сигнале стохастическим и разреженным образом.

Большинство существующих методов обнаружения событий представляют собой идентификацию скачкообразных изменений уровня ионного тока (рисунок 1.9). Изменения тока вычисляются/ранжируются и отсекаются при достижении определенного порогового значения (триггера). Такие методы поиска событий можно разделить на две категории: классический подход определения пользователем порога с помощью таких программ как MiniAnalysis [152], Easy Electrophysiology [153] and Clampfit [154] и более продвинутые методы,

использующие адаптивные или локальные пороги исходя из полученных данных, предполагая, что базовый ток стабилен во времени, реализованные в программах OpenNanopore [155], MOSAIC [156], EasyNanopore [157].

Также для детектирования транслокаций могут быть использованы модели машинного обучения для анализа обнаруженных событий: например, метод обучения для распознавания отдельных нуклеотидов с высокой точностью [158]. Не смотря на разработки в этой области, точное обнаружение событий по-прежнему остается главным и наиболее важным шагом в анализе исходных электрических сигналов. Классические инструменты обнаружения событий показывают хорошие результаты, используя метод сравнения амплитуды с пороговым значением, но в тоже время выбор подходящего порога является сложной задачей, поскольку требует ручной настройки исходя из полученных данных, что в значительной степени зависит от опыта исследователя. В программе OpenNanopore [155] используется модифицированный алгоритм кумулятивных сумм, при котором пороговое значение определяется на основе данных без дополнительного вмешательства человека, а в программе EasyNanopore [157] предложен метод, в котором порог фильтрации определяется как среднее значение плюс кратное стандартному отклонению всех текущих значений до определенной точки данных. Тем не менее, эти подходы требуют больших вычислительных затрат, а также наличие стабильной базовой линии. Для решения этой задачи сначала выполняется построение базовой линии, а затем идентифицируется событие, когда амплитуда превышает определенный пользователем порог [159].

Поиск событий можно разделить на несколько шагов:

1. Выбор и сегментация исследуемого участка токовой кривой.
2. Поиск и построение базовой линии.
3. Выбор порогового значения (триггера).
4. Автоматический поиск событий транслокаций с использованием ПО для идентификации событий по заданным параметрам.
5. Фильтрация недостоверных событий (шум, симметричные события)

С развитием методов поиска событий транслокации и их автоматизации стало возможным эффективно обнаруживать события на основе большого количества данных, внося существенный вклад на пути к секвенированию НК с помощью твердотельных нанопор.

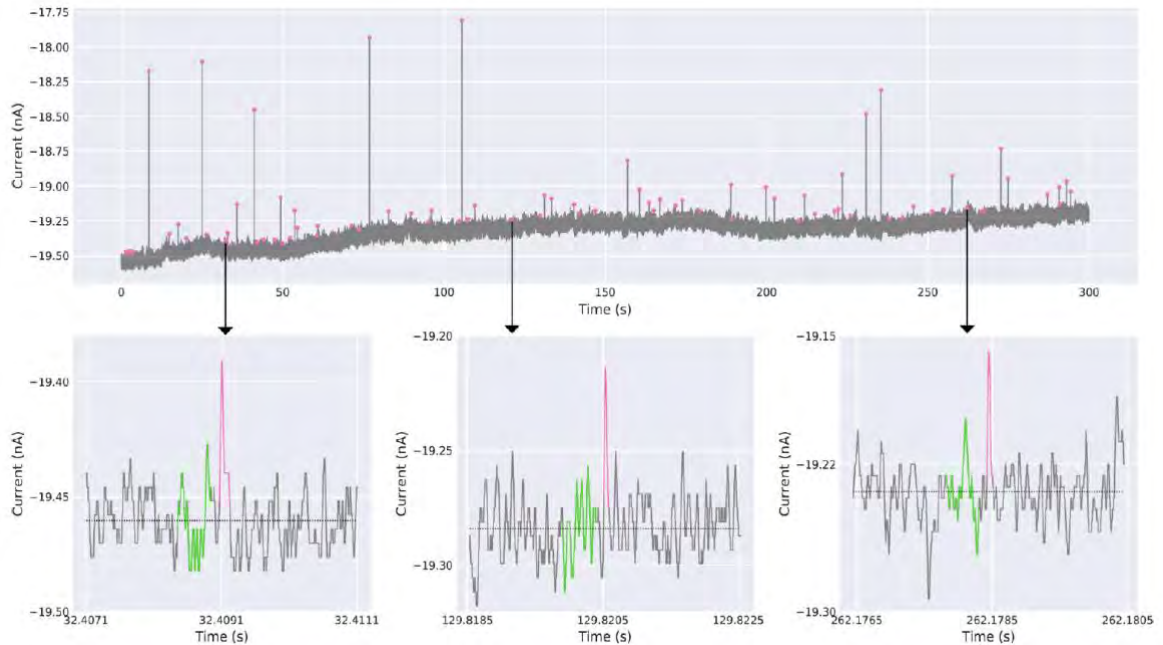


Рисунок 1.9 – Иллюстрация поиска событий транслокации, розовым показаны пики, отвечающие событию транслокации, зеленым показан участок сигнала без транслокаций [159]

1.6 Области применения наноструктур: обнаружения молекул, биодатчики, секвенирование

Твердотельные нанопоры и наноканалы, характеризующиеся свойствами переноса ионов, сравнимые с биологическими каналами, находят применение в биодатчиках, нанофлюидных логических устройствах и устройствах преобразования энергии, а также секвенировании НК.

Первоначальная идея детектирования с помощью нанопор заключалась в использовании твердотельных или биологических пор в качестве наноразмерных аналогов счетчика Коултера [160] для обнаружения и анализа отдельных молекул в жидкостях. Более двух десятилетий назад нанопоры привлекли к себе внимание как удобная структура, которую можно использовать в качестве молекулярного

«счетчика». В частности, первым изобретенным принципом нанопорового секвенирования является использование метода блокады ионного тока [161]. Этот принцип в настоящее время является наиболее изученной технологией, поскольку его простота позволяет снизить стоимость и размеры приборов. Измеряя изменение ионного тока во времени, вызванное перекрытием внутреннего объема биомолекулой или ее части во время электрофоретического прохождения через пору, можно определить сколько молекул прошло через сечение и/или размер молекулы.

Со временем начали разрабатываться платформы и устройства, нацеленные не только на подсчет событий транслокаций, но и распознавание молекул в зависимости от их основных характеристик, извлеченных из формы сигнала ионного тока.

Секвенирование ДНК

Одними из самых привлекательных применений являются секвенирование генома на основе нанопор. По аналогии с регистрацией сигнала при использовании белковых нанопор, азотистые основания ДНК будут вызывать разное изменение тока при ее транслокации через пору под действием электрического поля. Эти сигналы специфичны для нуклеотидов и поэтому в конечном итоге могут быть переведены в исходную последовательность ДНК [162].

Протоколы нанопорового секвенирования ДНК зависят от механизма обнаружения нуклеотидов. В настоящее время принципы обнаружения можно разделить на два типа: оптическое детектирование (т. е. флуоресцентное обнаружение) [163] и электрическое (по форме изменения электрического сигнала) [8]. Существует три принципа детектирования ДНК с использованием нанопор основанных на регистрации тока (рисунок 1.10).

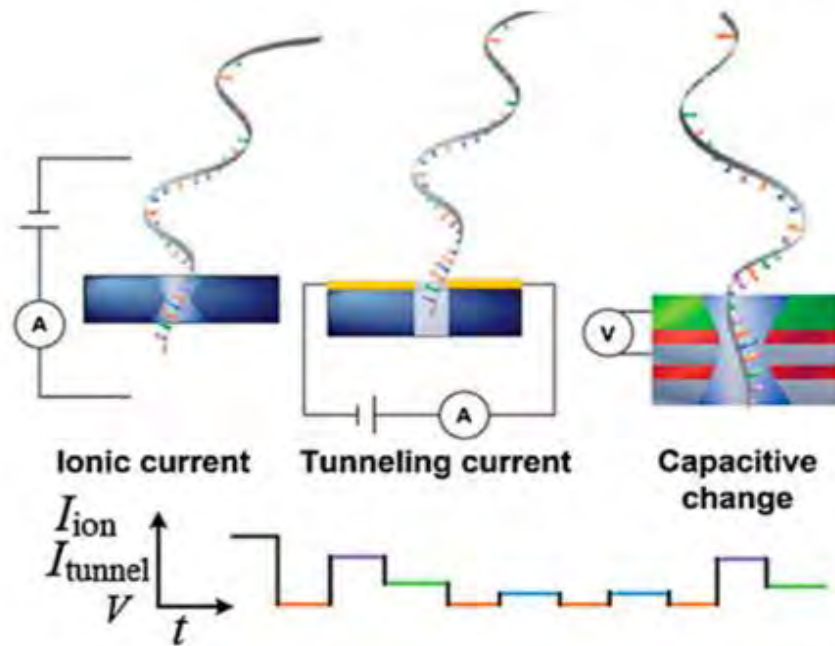


Рисунок 1.10 – Три принципа детектирования ДНК на основе твердотельных нанопор [164]

Обнаружение тока ионной блокады (ion current, рисунок 1.10) является одним из наиболее распространенных методов секвенирования, применяемым как для твердотельных, так и для биологических нанопор [165]. В этом методе мембрана с нанопорой размещается между двумя объемами. Молекулы ДНК или РНК вводятся в объем с отрицательным потенциалом, заполненный электролитом. При приложении разности потенциала возникают электрофоретические силы, которые способствуют движению отрицательно заряженных молекул НК через нанопору. При прохождении полимерной цепи через нанопору каждый тип нуклеотида по-разному блокирует пространство нанопоры, что приводит к изменению ионного тока, характеризующегося уникальной формой сигнала.

Однако на практике сложно различить нуклеотиды в движущейся цепочке ДНК, поскольку нуклеотиды четырех типов различаются лишь на несколько атомов по своей структуре. Кроме того, высокая скорость транслокации ДНК и ограниченное пространственное разрешение создают трудности в точном различении каждого нуклеотида.

Для повышения точности распознавания можно использовать метод обнаружения поперечного туннельного тока (tunneling current, рисунок 1.10) [166]. В этом методе туннельный ток возникает исключительно в результате присутствия нуклеотида в зазоре между двумя электродами. Химическая структура и "боковая" проводимость каждого типа нуклеотидов имеют уникальные характеристики, что вызывает различия в уровне туннельного тока. Однако следует учитывать, что туннельный ток значительно зависит от направления и ориентации молекулы нуклеиновой кислоты [167].

Альтернативный подход основан на изменении ёмкости (capacitive current, рисунок 1.10), который включает использование металл-оксидно-полупроводниковых структур. В данном методе, когда ДНК проходит через нанопору, управляемую внешним электрическим полем, конденсатор, сформированный проводниками, подвержен поляризации. Верхний и нижний проводники функционируют в качестве электродов для регистрации изменений потенциала, вызванных прохождением каждого нуклеотида через нанопору. Высокоскоростное обнаружение изменений ёмкости достигается за счет быстрого действия встроенного полевого транзистора. Однако точность измерений может быть затруднена из-за шума, вызванного случайными колебаниями температуры и молекулярным движением. Метод измерения туннельного тока и изменения ёмкости могут быть реализованы только в твердотельных нанопорах, так как необходима интеграция электродов непосредственно в пору.

На сегодняшний день несколькими зарубежными компаниями удалось вывести на рынок одномолекулярные секвенаторы на основе микро- и нанофлюидных технологий. Первой была компания Helicos BioScience, которая в 2009 году выпустила на рынок одномолекулярный флуоресцентный секвенатор HeliScore™, а также позднее свою продукцию предложили компании Oxford Nanopore, Pacific Biosciences [92,168,169].

Компания Oxford Nanopore Technologies (ONT) в 2014 году создала первый секвенатор с использованием биологических нанопор. Нанопоровые системы,

разработанные ONT, используются в устройствах MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION [170].

В технологиях Oxford Nanopore используются индивидуальные порообразующие белки, создающие поры в мембранах (рисунок 1.11).

Одним из важных элементов технологии компании ONT является хеликаза — молекулярный мотор, который расплетает двунитевую ДНК и замедляет продвижение одностречевой ДНК через нанопору. В настоящее время максимальная скорость расплетания ДНК с помощью этого мотора достигает 450 пар нуклеотидов в секунду. Качество секвенирования зависит от величины прикладываемого потенциала, электропроводности и ионного состава буфера, таким образом секвенирование на основе нанопор требует тщательной оптимизации всех параметров, включая мембрану, нанопору, хеликазу, условия секвенирования и алгоритмы расшифровки сигналов.

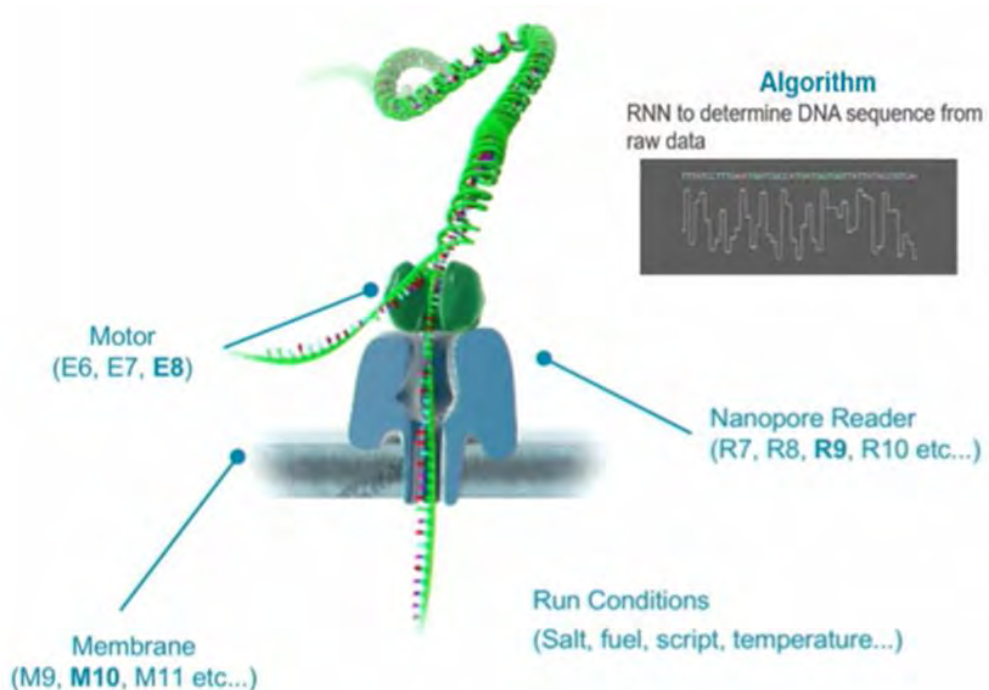


Рисунок 1.11 – Принцип работы секвенатора на основе биопор [171]

Нанопоровое секвенирование позволяет отказаться от стадии ПЦР при достаточном количестве выделенного генетического материала из биологического образца. Отсутствие стадии амплификации ДНК при пробоподготовке позволяет

ускорить анализ, а также требует меньшего количества реагентов, делая исследование более мобильным и удешевляя процесс.

Хотя создание твердотельного одномолекулярного секвенатора является актуальной задачей, на данный момент на рынке не представлены коммерческие твердотельные нанопоровые секвенаторы.

Для разработки твердотельного нанопорового датчика необходимо одновременно обеспечить создание устройства с требуемыми параметрами, чтобы продемонстрировать фактическое секвенирование ДНК. В частности, создать массив нанопор, расположенный в ультратонкой мембране и обеспечить контроль скорости ДНК и идентификацию четырех нуклеотидов. Учитывая, что радиус спирали ДНК составляет $\sim 1,4$ нм, для секвенирования требуются нанопоры диаметром < 2 нм.

Одним из интересных и перспективных направлений в области нанопорового секвенирования являются работы посвященные возможности объединения нанопор с транзисторами, например, с технологией комплементарной логики на транзисторах металл-оксид-полупроводник (КМОП), которая составляет подавляющее большинство микроэлектронных компонентов в приборах вычислительной техники. Все платформы NGS ((next-generation sequencing или секвенирование нового поколения) в конечном счете используют технологию КМОП в виде высокоскоростных вычислительных элементов (т. е. традиционных микропроцессоров) для преобразования своих необработанных измерений в фактические последовательности ДНК [7].

Xie и др. [172] описали датчик, объединяющий твердотельные нанопоры с кремниевыми нанопроводными полевыми транзисторами (FETs) на мембране Si_3N_4 . Сигналы полевого транзистора и сигналы ионного тока блокады наблюдаются одновременно во время прохождения ДНК через нанопору. Было продемонстрировано, что нанопроволоки могут достигать высокой скорости и чувствительности в качестве химических и биологических датчиков. Подобная конструкция позволяет повысить чувствительность методов нанопорового секвенирования.

Картирование с помощью наноканалов

Наноканалы в свою очередь могут быть использованы для картирования геномов с высоким разрешением [173]. Для замедления движения ДНК через пору можно использовать наноканалы, характеризующиеся, в отличие от нанопоры, большим соотношением длины и ширины. В работе [174] авторы попытались замедлить время прохождения ДНК в наноканале, объединив нанометровый канал и нанопилларную матрицу. Нанопиллары это наноструктуры в форме столбов диаметром около 10 нанометров, которые могут быть сгруппированы в решетчатые массивы. Подобные наноструктуры могут растягивать одиночные молекулы ДНК перед вводом в наноканал, а снижение скорости обеспечивается за счет силы трения в канале.

Существует подход, разработанный для картирования крупных фрагментов ДНК, основанный на методе гидродинамического фокусирования в микрофлюидике. В этом методе молекулы ДНК, меченные флуоресцентной пептидной нуклеиновой кислотой, временно растягиваются в микроканале и детектируются при прохождении флуорофоров мимо сенсора [175]. Этот метод подходит для создания карт малых геномов для сопоставления с картами известных геномов, его пропускная способность и разрешение накладывают серьезные ограничения на крупномасштабное картирование генома.

Существуют разные подходы для реализации оптического картирования ДНК с использованием наноканалов. Например, рестрикционное картирование. Это техника определения положения нуклеотидной последовательности (гена) на генетической (физической) карте с помощью фермента эндонуклеазой рестрикции-модификации (*рестриктазы*). Классически рестрикционное картирование осуществляется путем обработки ДНК-мишени эндонуклеазой, а затем разделения фрагментов по размеру с помощью гель-электрофореза. Электрофоретическое рестрикционное картирование требует относительно большого количества ДНК. При этом получают только относительные размеры фрагментов и теряется их упорядоченность [176]. Традиционное картирование ДНК требует использования ферментов для предварительной подготовки ДНК. Геномную информацию можно

получить из отдельных молекул ДНК через зависящую от последовательности термическую денатурацию двухцепочечной ДНК. Такая карта называется картой денатурации. В [177] показано, что можно провести оптическое картирование денатурации ДНК в водном растворе с использованием флуоресцентно меченой ДНК, вытянутой в наноканалах.

1.7 Заключение к литературному обзору

Обзор и анализ современных литературных источников подчеркивают актуальность исследований в области микро- и нанофлюидики, направленных на разработку новых устройств с интегрированными наноструктурами. Принцип действий таких устройств основан на взаимодействии твердотельных нанопор/наноканалов с исследуемыми молекулами.

В настоящее время коммерчески доступные приборы для секвенирования ДНК основываются на использовании белковых нанопор, что представляет собой одну из передовых технологий в этой области. Тем не менее, разработка твердотельных нанопоровых сенсоров остается важной и актуальной задачей. Устройства, использующие твердотельные нанопоры, предлагают потенциальные преимущества, такие как улучшенная стабильность и производительность по сравнению с белковыми нанопорами, что может способствовать дальнейшему совершенствованию методов детектирования и секвенирования и расширению их применения в различных областях биологии и медицины. Основными препятствиями реализации твердотельного нанопорового секвенатора являются создание ультратонкой мембраны для достижения высокого пространственного разрешения и контроль скорости транслокации молекул, обусловленный значительной локализацией электрического поля в области поры, а также сложный механизм взаимодействия между молекулой ДНК и поверхностью поры.

В результате проведенного литературного обзора было установлено, что для успешного изучения процессов, происходящих в твердотельных нанопорах и наноканалах, ключевой задачей является исследование ионного и молекулярного транспорта, в частности, свойства селективности. На данный момент доказано, что

твердотельные наноструктуры могут демонстрировать ионную селективность, аналогичную биологическим ионным наноканалам. Уменьшение диаметра твердотельных нанопор приводит к более высокой селективности за счет увеличения проводимости и более плотного распределения поверхностного заряда на стенках.

В обзоре также рассмотрено современное состояние исследований и методов изготовления микроканалов, а также твердотельных наноструктур (нанопор/наноканалов), освещаются их ключевые характеристики. Так, одним из наиболее распространенных методов формирования твердотельных нанопор/наноканалов в кремнии является травление с помощью сфокусированного электронного или ионного луча, который может применяться для ионно-индуцированного осаждения или травления с наноразмерным разрешением, а также для устранения дефектов в полупроводниковой промышленности. Травление сфокусированным ионным лучом является привлекательным методом для формирования наноразмерных структур непосредственно на твердых подложках, не требуя масок или фоторезисторов. Также этот метод позволяет достигать высокой точности в контроле размеров пор (<1 нм) и их конфигурации. Кроме того, нанопоры, сформированные в твердотельных материалах, обладают химической и термической стабильностью, а также возможностью модификации поверхности, что открывает новые перспективы для разработки более эффективных и надежных устройств секвенирования. Ввиду перечисленных преимуществ, в настоящей работе был выбран данный метод изготовления наноструктур.

Особое внимание в обзоре уделено особенностям экспериментальных исследований, связанных с твердотельными нанопорами/наноканалами. Установлено, что, важными аспектами при разработке новых устройств на основе наноструктур, способных демонстрировать сенсорные свойства, необходимые для эффективного детектирования молекул, являются способ управления транспортом молекул, а также модификация поверхности мембраны для обеспечения высокой гидрофильности и повышения соотношения сигнал/шум. Не менее важны

герметичность измерительной ячейки и правильный анализ полученных данных при детектировании. Эти факторы играют критическую роль в обеспечении высокой чувствительности и точности будущего устройства, их необходимо учитывать при разработке и изготовлении электрохимической измерительной ячейки с твердотельной нанопорой. Также стоит отметить, что в литературе отсутствуют подробные протоколы подготовки твердотельных нанопор для экспериментов по изучению ионного и молекулярного транспорта, поэтому требуется создание протокола их подготовки и методики проведения экспериментов, учитывающих перечисленные особенности.

Из рассмотренных способов управления транспортом и захвата биомолекул в микро- и наноструктурах наиболее целесообразным для управления движения биомолекул через наноразмерные структуры представляется использование электрофоретического метода, так как с помощью приложения электрического поля к нанопоре можно создать направленные электрофоретические и электроосмотические потоки и манипулировать молекулами, которые обладают собственным электрическим зарядом. Хотя электрофорез обладает и некоторыми недостатками, в частности, для создания электрического поля требуется прямой контакт электродов с раствором, что влечет за собой технологические трудности, а также может вызывать локальный нагрев раствора и электрохимические реакции. Использование одновременно электрофоретического и электроосмотического потока позволяет повысить точность перемещения ДНК, уравновесивая противоположные потоки.

2 Изготовление микрофлюидного устройства и исследование транспортных свойств наноканалов

2.1 Изготовление микрофлюидного устройства с наноканалами

Для исследования транспортных свойств в наноразмерных структурах было создано кремний-стеклянное микрофлюидное устройство с наноканалами.

Для этого была разработана оригинальная топология X-образной формы, представляющая собой два микроканала, разделенные тонкой мембраной, в которой в дальнейшем формировались наноканалы. Для исключения эффектов, связанных с концентрационной поляризацией, необходимо обеспечить возможность создания потоков рабочих растворов на входе и выходе в наноканал. Этим требованиям соответствует X-образная геометрия микроканалов. На рисунке 2.1 представлены результаты моделирования распределения скоростей в COMSOL Multiphysics®, направления потока указаны стрелками. Для построения модели используется физический интерфейс Laminar flow (ламинарный поток). Начальные условия присваивают с помощью задания области Initial Values в соответствующем разделе модели. Для постановки начальных условий задавались поля скоростей. Граничными условиями являются условия входа и выхода, а также условия на стенках каналов. Граничное «условие входа» (Inlet) указывалось на входе в микроканалы. На границе задается равномерный скоростной профиль (Normal Inflow velocity) $u=U_0=0,3$ м/с. Граничное условие «выход» (Outlet) задавалось на границе, где находятся выходы из микроканала. В качестве настройки граничного условия выхода использовалось установленное по умолчанию условие Pressure, задающее избыточное давление на границе, необходимое для интегрирования уравнения Навье-Стокса. Избыточное давление равно 0. Граничное условие на стенке канала (Wall) устанавливалось No slip – отсутствие трения.

В результате моделирования было наглядно продемонстрировано распределение скоростей внутри микроканалов.

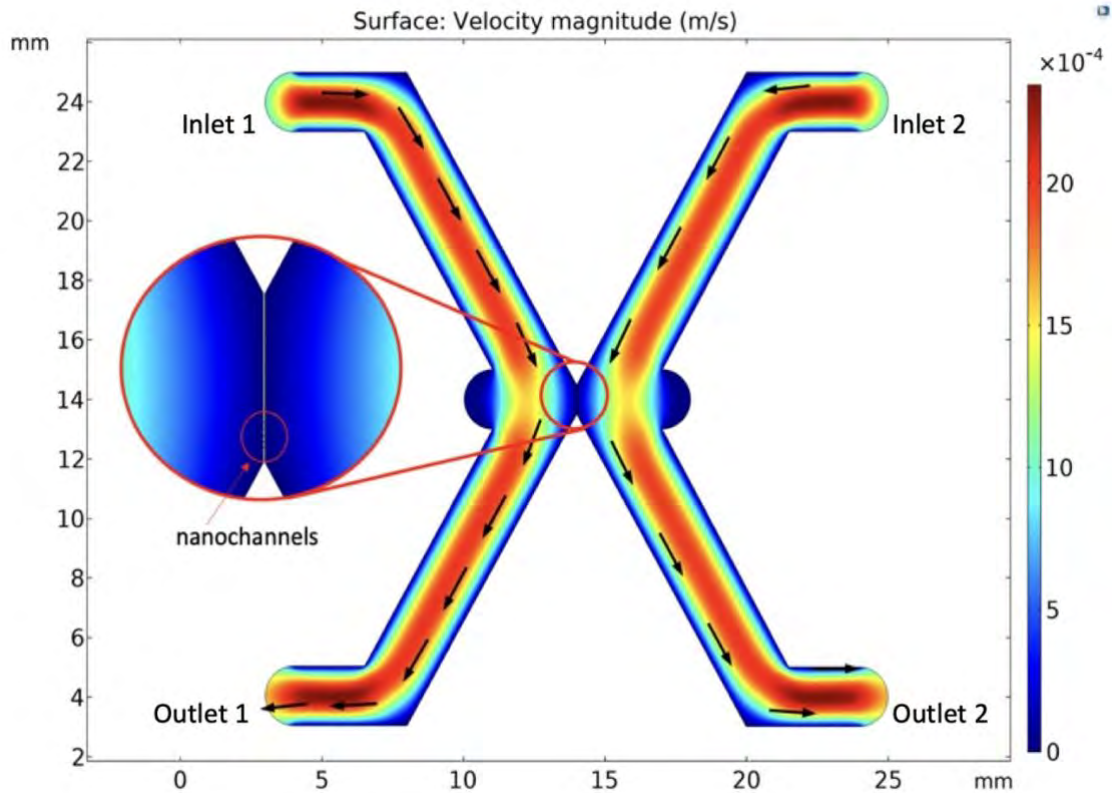


Рисунок 2.1 – Распределение скоростей внутри микроканалов МФУ, направления потока показаны стрелками

МФУ с наноканалами были изготовлены методами оптической литографии и травления сфокусированным ионным лучом (focused ion beam, FIB). МФУ были герметизированы стеклянными пластинами методом анодного сваривания. Этапы изготовления МФУ показаны на рисунке 2.2.

Сначала на поверхности кремниевой пластины был сформирован слой оксида кремния 250 нм, чтобы получить химически и биологически инертный материал с хорошо изученными свойствами поверхности в водных растворах солей (в том числе свойствами двойного электрического слоя). Процесс термического окисления в кислородной среде проводился при температуре 1100°C попеременно в потоке сухого кислорода и смеси кислорода и водяного пара. После этого для травления X-образных микроканалов были использованы оптическая литография и плазменное травление. Глубина полученных микроканалов составляет 10 мкм. В ходе травления между X-образными микроканалами формировалась мембрана,

разделяющая чип на две части. Затем в этой мембране ионным лучом формировались наноканалы.

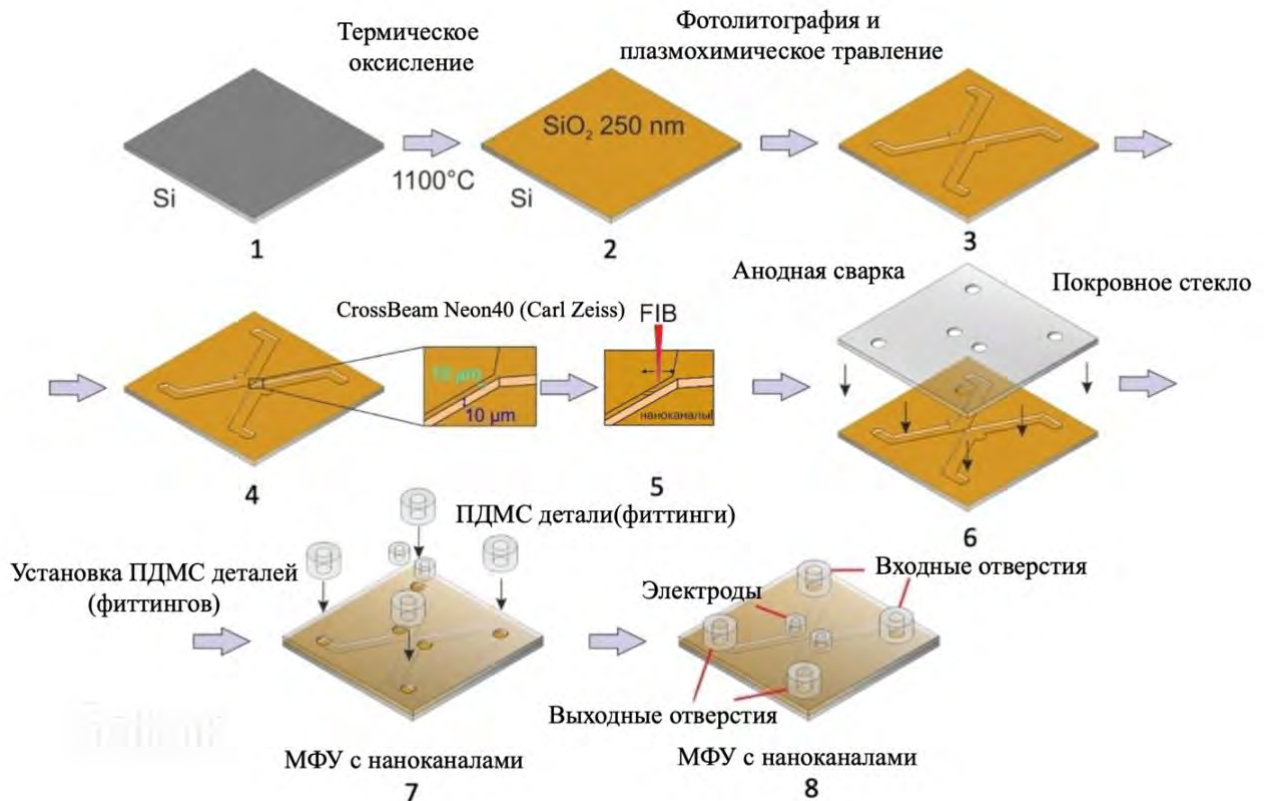


Рисунок 2.2 – Этапы изготовления микрофлюидного устройства с наноканалами

Для формирования наноканалов и управления процессом травления сфокусированным ионным лучом использовались системы перекрестных электронных и ионных пучков CrossBeam Neon40 (Carl Zeiss). Травление осуществлялось с помощью ионов галлия при ускоряющем напряжении 30 кВ, токе ионного пучка 10 пА. Травление проводилось вдоль участка длиной 10 мкм.

На рисунке 2.3а приведена топология микрофлюидного чипа. Полученные микро- и наноканалы были визуализированы и охарактеризованы с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ). РЭМ изображения показывают, что толщина мембраны равна 10 мкм, а ее край между двумя микроканалами имеет относительно пологий наклон (рисунок 2.3b). На рисунке 2.3 с-d показаны РЭМ изображения сформированных наноканалов.

РЭМ изображения позволяют получить информацию только о ширине наноканалов, поэтому для оценки глубины была использована атомно-силовая микроскопия (АСМ).

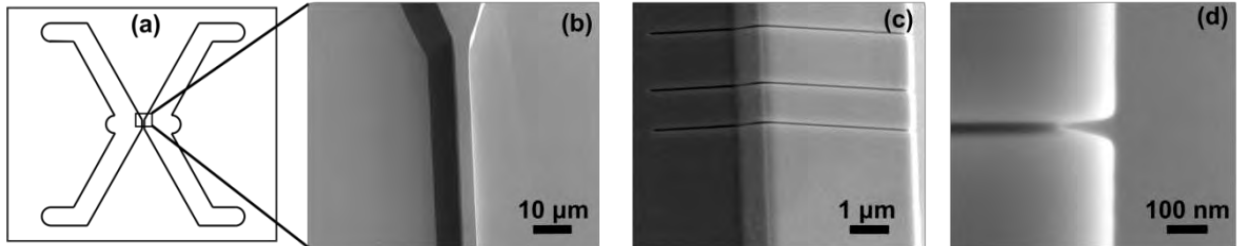


Рисунок 2.3 – а: Топология микрофлюидного чипа, b-d: изображения наноканалов в кремниевой мембране полученные с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ)

Исследовалась зависимость геометрических размеров наноканала от времени травления в интервале от 2 до 60 с. Травление проводилось при токе ионного пучка 10 пА. При времени травления менее 2 с размеры каналов не воспроизводились. На рисунке 2.4 показана зависимость ширины и глубины наноканалов от времени травления, полученная с помощью АСМ с острым кремниевым зондом (НА-FM, NT-MDT SI Ltd).

При времени травления более 2 с, но менее 10 с ширина каналов существенно не изменяется, после 10 с ширина канала увеличивалась с зависимостью близкой к линейной. Зависимость глубины каналов от времени близка к линейной в интервале времени травления от 2 до 20 с, а затем выходит на насыщение. Это, вероятно, может быть связано с явлением повторного осаждения ионов во время травления. По полученным данным, для изготовления наноканалов в микрофлюидных устройствах время травления было выбрано равным 10 с. Это время обеспечило достаточную ширину и глубину наноканалов для дальнейшего изучения ионно-транспортных свойств. Ширина каналов, полученная при минимальном времени травления 10 с составляет 50-60 нм, глубина около 10 нм при токе ионного пучка 10 пА.

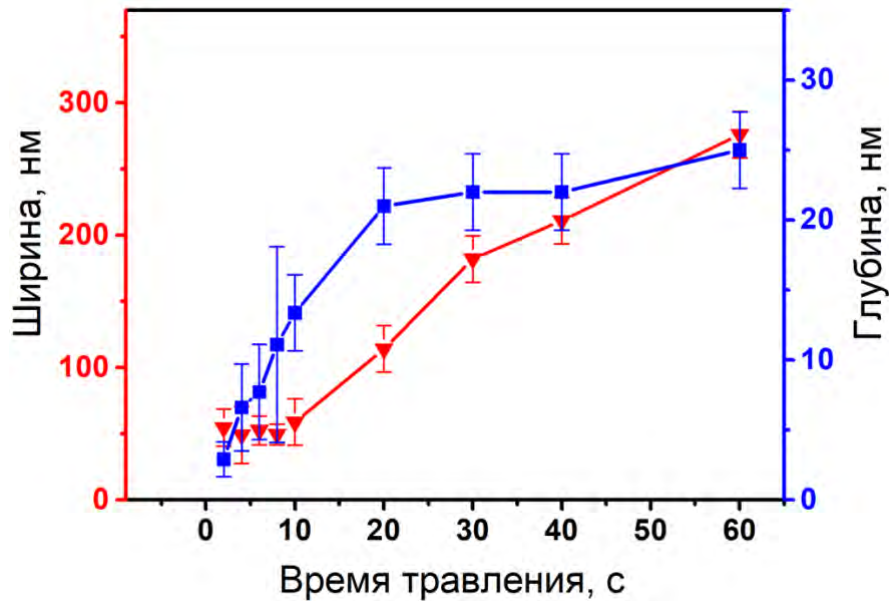


Рисунок 2.4 – Зависимость ширины и глубины наноканалов от времени травления

Оригинальным решением в изготовлении МФУ стал способ герметизации. Это важный технологический этап, определяющий качество последующих исследований и срок службы устройства. Простейшим и широко распространенным методом герметизации является использование полимерной пленки из ПДМС в качестве покровного слоя [178], что ранее и использовалось: после травления системы микро- и наноканалов, герметизация производилась путем соединения кремниевой подложки со слоем ПДМС для формирования микрофлюидного устройства [68]. Для этого поверхность чипа и пленка ПДМС были предварительно обработаны в кислородной плазме и соединены друг с другом для образования неразъемного соединения. Однако этот метод имеет ряд существенных недостатков. В частности, неустойчивость к давлениям более 0,5 атм., что приводит к необходимости работать с очень низкими расходами рабочих растворов, плохая адгезия полимера к поверхности кремния, а также свойства самого ПДМС, который является пористым и нестабильным во времени материалом, способным поглощать малые молекулы. Помимо этого, из-за пористой природы полимера срок службы таких МФУ ограничен из-за наличия токов утечки [178].

Для устранения этих недостатков, для герметизации используется метод анодного сваривания, реализованный на АО «Светлана-Электронприбор» (СПб). С помощью анодного сваривания создается прочное соединение между поверхностью кремния (оксида кремния) и покровным боросиликатным стеклом толщиной 450 мкм, шероховатость которого составляла менее 5 нм.

В стеклянной пластине формируются входные и выходные отверстия диаметром 2 мм, необходимые для загрузки рабочих растворов в каждый микроканал, а также отверстия для подвода электродов к рабочей зоне.

Перед анодным свариванием поверхность стекла последовательно очищается толуолом, ацетоном и хромовым ангидридом, а затем сушится. Поверхность кремниевого чипа обрабатывается в толуоле и ацетоне для удаления органических загрязнений. Для сваривания использовалась установка, обеспечивающая режимы сварки: ток — (140-190) А, приложенное напряжение — (800-950) В, температуру — (390-410) °С, время сварки — 30 мин. Схема метода анодного сваривания представлена на рисунке 2.5.

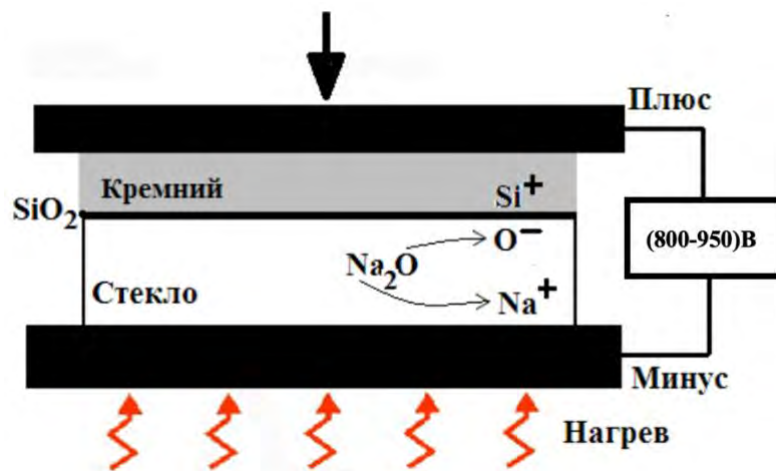


Рисунок 2.5 – Схема анодной сваривание

Для крепления подводящих капилляров и электродов к микрофлюидному устройству использовались специальные детали (фитинги), которые были изготовлены методом «мягкой» литографии из ПДМС марки Sylgard 184 (Dow Corning, США) (рисунок 2.6).

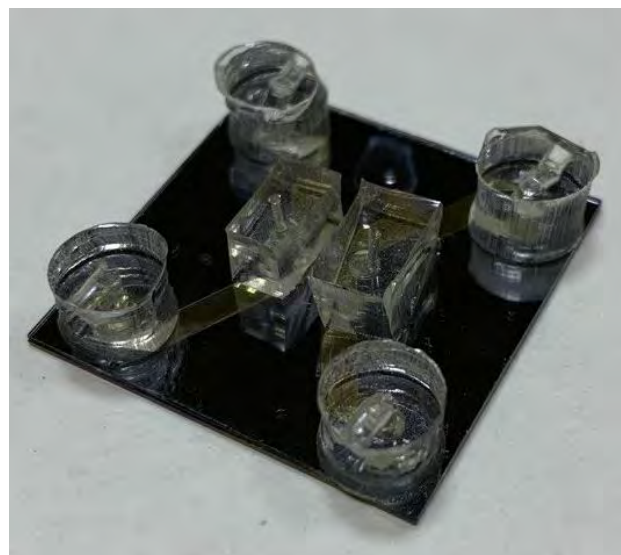
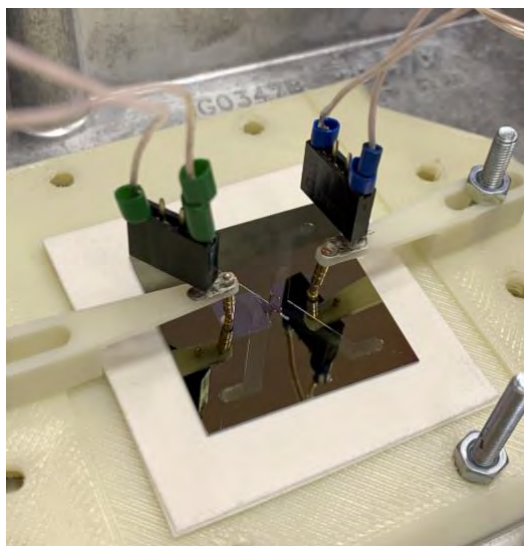


Рисунок 2.6 – МФУ с подведенными прижимными контактами (слева) и оснащенный ПДМС фитингами (справа)

Проверка герметичности МФУ показала, что оно сохраняет свои свойства при давлении до 202650 Па без повреждения наноструктур. Полученное МФУ можно повторно использовать после разработанной процедуры восстановления (очистки и промывки каналов).

Процедура восстановления МФУ состоит из нескольких шагов. Сперва ПДМС фитинги механически удаляются с помощью лезвия ножа. Затем МФУ погружают в раствор хромового ангидрида на сутки для удаления остатков ПДМС и органических загрязнений. Далее устройство промывается изопропаноловым спиртом и деионизованной водой. После всех процедур, МФУ сушится при температуре = 110 °С. Такая обработка гарантирует, что МФУ будет восстановлено и готово к использованию, что подтверждается получением воспроизводимых результатов и хорошим согласованием экспериментальных данных с теоретической моделью.

Предложенный способ изготовления позволяет создавать герметичные МФУ с двумя микроканальными системами, разделенными мембраной с наноканалами. Таким образом было изготовлено 3 устройства, в каждом устройстве были сформированы 15 каналов, и погрешность в их размерах составила не более 20%.

2.2 Изучение транспортных свойств наноканалов

Для исследования транспортных свойств наноканалов путем измерения ионной проводимости [179] была собрана установка, представленная на рисунке 2.7.

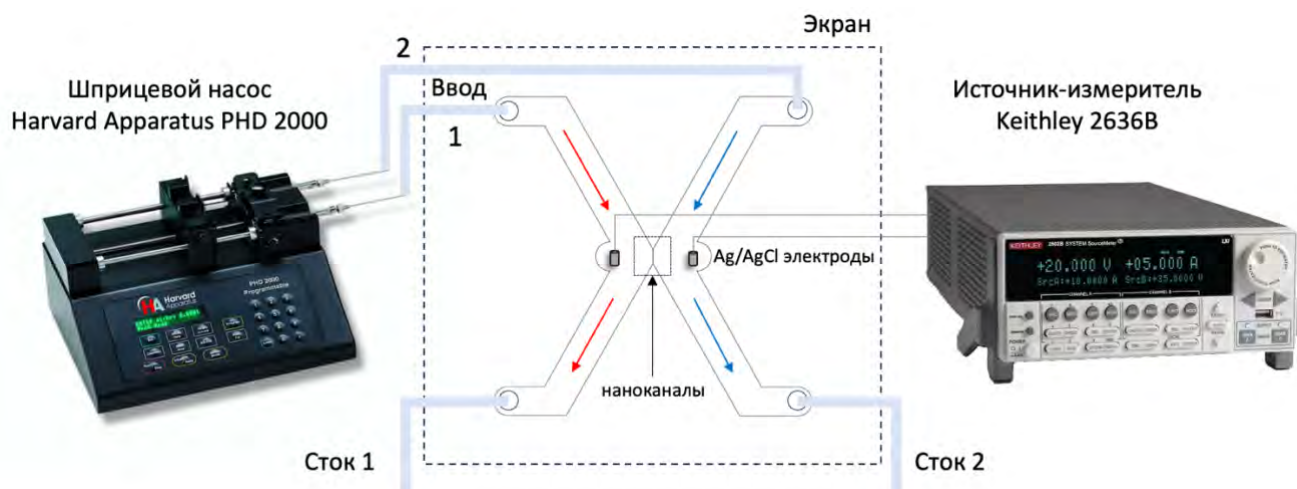


Рисунок 2.7 – Измерения ВАХ в МФУ: шприцевым насосом Harvard Apparatus PHD через подводящие капилляры подается рабочий раствор во входные отверстия МФУ, AgCl/Ag электроды расположены с двух сторон от мембраны с наноканалами и подключены к измерителю Keithley 2636B

С помощью двухканального шприцевого насоса Harvard Apparatus PHD 2000 (США) и системы подводящих капилляров с внутренним диаметром 0,8 мм во входные отверстия МФУ подавался водный раствор KCl заданной концентрации в диапазоне от 0,1 мМ до 1М.

Скорость заполнения микроканалов 30 мкл/мин. Такая скорость была выбрана для визуального контроля заполнения чипа. После того, как каналы чипа заполнились раствором, его оставляли на время не менее получаса. Подвод хлорсеребряных электродов и их герметичность обеспечивалась ПДМС фитингами, расположенными по разные стороны от мембраны с наноканалами, так, чтобы электроды были погружены в раствор. Поверхность электродов обновлялась путем хлорирования серебряных проволок в 1М растворе KCl перед каждым экспериментом.

Для всех экспериментов (в том числе и для промывки чипа) использовалась деионизованная (Milli-Q) вода с удельным сопротивлением 10^{18} Ом/см.

Перед измерениями МФУ помещали в металлический короб (экран), представляющий собой клетку Фарадея. Ионную проводимость в наноканалах определяли путем измерения ВАХ с помощью источника-измерителя Keithley 2636B. При измерении на приборе выставлялись следующие параметры: начальное и конечное напряжения от -0,2 до 0,2 В, количество точек 1000, лимит по току 0,1 А, время интегрирования по току 20 мс и время между точками измерения 0,5 с. Keithley 2636B позволяет измерять токи вплоть до 10^{-13} А.

Важно отметить, что при низких концентрациях электролита (менее 0,01 М) на ВАХ наблюдается гистерезис (рисунок 2.8а). Этот гистерезис связан с емкостной составляющей сопротивления наноканалов, которая вызвана накоплением встречных ионов на входе и выходе канала при быстром развертывании потенциала. Чтобы устранить этот эффект время измерения было увеличено со 160 с до 960 с. Таким образом, во всех случаях была получена почти линейная ВАХ (рисунок 2.8б). В то же время линейный характер кривой ВАХ сохранялся даже при относительно высоких напряжениях смещения (-1 ... + 1 В). Оценивая наклон линейной ВАХ, можно получить значение проводимости.

Измерения ВАХ с повторами проводились при разных концентрациях рабочего раствора, которые варьировались от 10^{-4} до 10^{-1} М.

Для определения химической стойкости полученных МФУ с наноканалами измерения ВАХ проведены на одном и том же устройстве при одинаковых условиях после 3 месяцев хранения (рисунок 2.8б). Результаты измерений показали изменение лишь на 10%, подтверждая, что свойства наноканалов не изменяются со временем и обладают достаточно высокой воспроизводимостью. Кроме того, в ходе экспериментов было установлено, что каналы восстанавливаются после тщательной промывки деионизованной водой между измерениями, обеспечивая возможность проведения измерений при переходе от более низких концентраций к более высоким и наоборот. Между экспериментами МФУ необходимо хранить заполненное чистой водой в герметичной таре при влажности близкой к 99%.

Для получения объективных результатов ВАХ записывались 10 раз для каждой концентрации электролита. Ошибка измерения составила 5%.

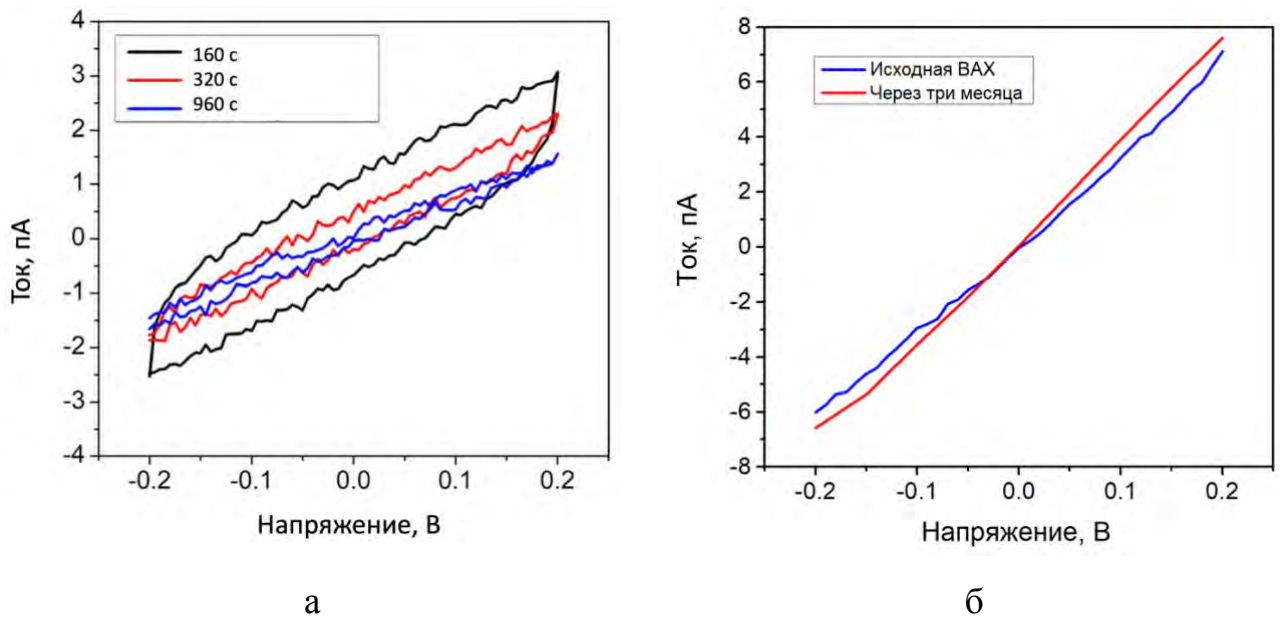


Рисунок 2.8 – а. Вольт-амперные характеристики ансамбля из 15 наноканалов, зарегистрированные при разном времени развертки (160, 320, 960 с). б.

Исходная вольт-амперная характеристика и через 3 месяца

Для теоретического описания процессов транспорта ионов через наноканалы применялась модель с постоянным потенциалом (глава 1, раздел 1.3), которая выводится из уравнений Навье-Стокса, Нернста-Планка и Пуассона [121].

На рисунке 2.9 представлена зависимость ионной проводимости наноканалов от концентрации раствора КСl. Экспериментальные данные получены на чипе с 15 параллельными наноканалами.

Исходя из полученных результатов, следует, что проводимость практически не меняется с увеличением концентраций рабочего раствора от 10^{-4} до 10^{-2} М. Это можно объяснить перекрытием двойных электрических слоев противоположных стенок наноканалов, которые при низких концентрациях превосходят размер каналов, создавая непрерывную заряженную область и влияют на транспортные свойства. Толщина двойного электрического слоя для данных концентраций соответствует $3 \cdot 10^{-8}$ и $3 \cdot 10^{-9}$ м. Однако при более высоких концентрациях рабочего

раствора проводимость увеличивается, так как толщина двойных электрических слоев уменьшается (для 100 мМ раствора толщина двойного электрического слоя ~ 1 нм) и перекрытие исчезает.

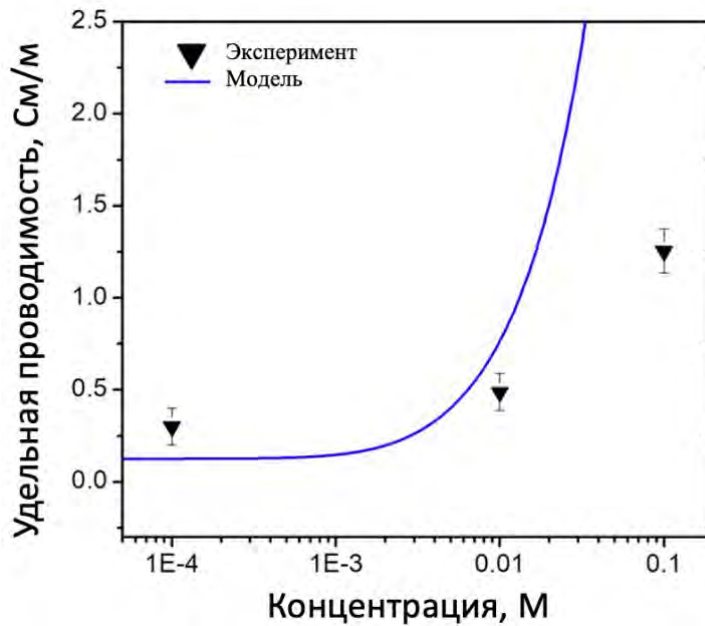


Рисунок 2.9 – Экспериментальная и теоретическая зависимости ионной проводимости наноканалов от концентрации рабочего раствора. Погрешность измерений составила 10-15%

Так наблюдается, что в зависимости от толщины ДЭС может меняться удельная проводимость, что свидетельствует о наличии зарядовой селективности наноканалов.

Для оценки величины заряда на внутренней поверхности наноканала использовалась та же математическая модель, что и для аппроксимации результатов. Так, анализ экспериментальных данных показал, что значения проводимости соответствуют каналам с эффективным диаметром 20 нм и поверхностной плотностью заряда $1,5 \text{ мКл/м}^2$.

Уменьшение эффективного диаметра может быть связано с возможным изменением поверхностных свойств в местах сопряжения кремниевой пластины и стекла при анодном сваривании. Более того, возможно, во время процесса анодного сваривания ионы K^+ Na^+ , содержащиеся в стекле, могли также сформировать

избыточный заряд на внутренней поверхности канала, который может вносить вклад при измерении ионных токов.

Дополнительно, была изучена диффузия модельных растворов через наноканалы с помощью конфокальной оптической микроскопии. Для этого был проведен эксперимент с помощью экспериментальной установки, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SL (Leica, Германия) для наблюдения флуоресценции в режиме отраженного света, и шприцевого насоса для подачи жидкостей с постоянной скоростью. Один микроканал МФУ заполнялся 0,1 М раствором NaOH, а второй - раствором флуоресцеина с концентрацией 10^{-5} моль/л в 0,1 М NaOH. После загрузки растворов в каналы МФУ оставляли на 15 минут. На рисунке 2.10б видно, что раствор NaOH через наноканалы равномерно распространяется во всех направлениях в канал, где находился раствор флуоресцеина.

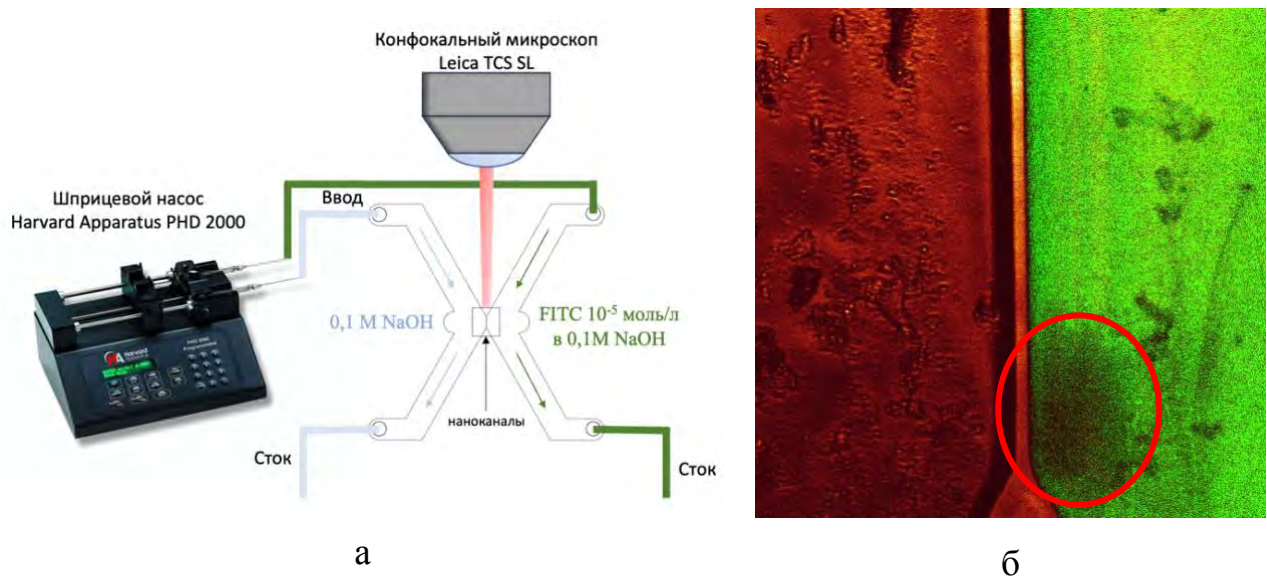


Рисунок 2.10 – а. Схема эксперимента по наблюдению диффузии раствора через наноканалы. б. Область переноса вещества диффузией потока NaOH (левая часть изображения) через наноканалы в микроканал с флуоресцеином (правая часть изображения, выделено красным)

Был оценен коэффициент диффузии с помощью формулы Эйнштейна-Стокса:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_{NaOH}} = 1,7 \cdot 10^{-10}, \quad (2.1)$$

где η – коэффициент динамической вязкости жидкости $10^3 \text{ Па} \cdot \text{с}$, $r_{NaOH} = 1,25 \text{ нм}$. Диффузное расстояние за время 15 минут составила $\delta_{\text{теор}} = \sqrt{2Dt} = 500 \text{ мкм}$, $\delta_{\text{эксп}} = 100 \text{ мкм}$.

Сравнение теоретической и экспериментальной оценок коэффициента диффузии согласуются с точностью до порядка.

Таким образом, с использованием микроскопии высокого разрешения была подтверждена диффузия жидкости через сформированные наноканалы и герметичность системы.

2.3 Заключение ко 2 главе

Разработан и апробирован способ изготовления кремний-стеклянного МФУ с наноканалами методами оптической литографии и травлением сфокусированным ионным лучом. Герметизация устройства осуществлена анодным свариванием. Полученные наноразмерные структуры охарактеризованы методами АСМ и РЭМ. Толщина мембраны, разделяющей два микроканала составляет 10 мкм. Данные, полученные при изучении влияния времени травления на ширину и глубину наноканалов, свидетельствуют, что ширина каналов после 10 секунды травления увеличивается с зависимостью близкой к линейной, в то время как глубина наноканалов изменяется сразу после начала травления, выходя на насыщение после 20 секунды. Такой эффект связан с явлением повторного осаждения ионов галлия во время травления. При выбранном минимальном времени травления 10 секунд глубина наноканалов составляет $\sim 10 \text{ нм}$, ширина $\sim 50\text{-}60 \text{ нм}$.

Исследован ионный транспорт в наноканалах при измерении ионной проводимости. Получены значения проводимости для наноканалов при разных концентрациях рабочего раствора KCl в диапазоне от 0,1 мМ до 0,1 М. С помощью одномерной модели аппроксимированы экспериментальные результаты, определен эффективный диаметр наноканалов 20 нм и плотность поверхностного

заряда внутри канала, которая составила $1,5 \text{ мКл/м}^2$. Подтверждено наличие зарядовой селективности в наноканалах.

С использованием микроскопии высокого разрешения – конфокальной сканирующей лазерной микроскопии подтверждена диффузия жидкостей через сформированные наноканалы, а также герметичность полученного устройства.

3 Твердотельные нанопоры в свободно-подвешенной мембране SiN_x/Si: изготовление, подготовка, методика измерений.

3.1 Изготовление полупроводниковых мембран SiN_x/Si с интегрированными нанопорами

Для изготовления образцов была использована технология формирования нанопор в свободно-подвешенной мембране из нитрида кремния [180]. Технология включает несколько этапов, представленных на рисунке 3.1. Сначала формируется свободно-подвешенная мембрана SiN_x/Si. Для этого слой SiO₂ термическим окислением наносится на двустороннюю полированную пластину Si (100). Затем, на слой SiO₂ наносится слой SiN_x толщиной 40 нм методом химического осаждения из газовой фазы при низком давлении (LP-CVD) [14]. Толщина этого слоя определяет длину будущих пор. В слое SiN_x с помощью фотолитографии (с использованием фоторезиста AZ 3027) создаются квадратные окна для дальнейшего анизотропного травления кремниевой пластины.

В результате на поверхности SiN_x была получена маска с открытыми участками в виде квадратов. Для удаления "открытых" окон из SiN_x было использовано плазмохимическое травление рабочим газом CF₄. Затем было проведено жидкостное анизотропное травление кремниевой пластины в 20% КОН при температуре 85°C. Время травления составляло 4 часа, а в качестве маски для травления выступал слой SiN_x. В результате была получена свободно-подвешенная мембрана SiN_x/Si на основе кремния квадратной формы со стороной 65 мкм.

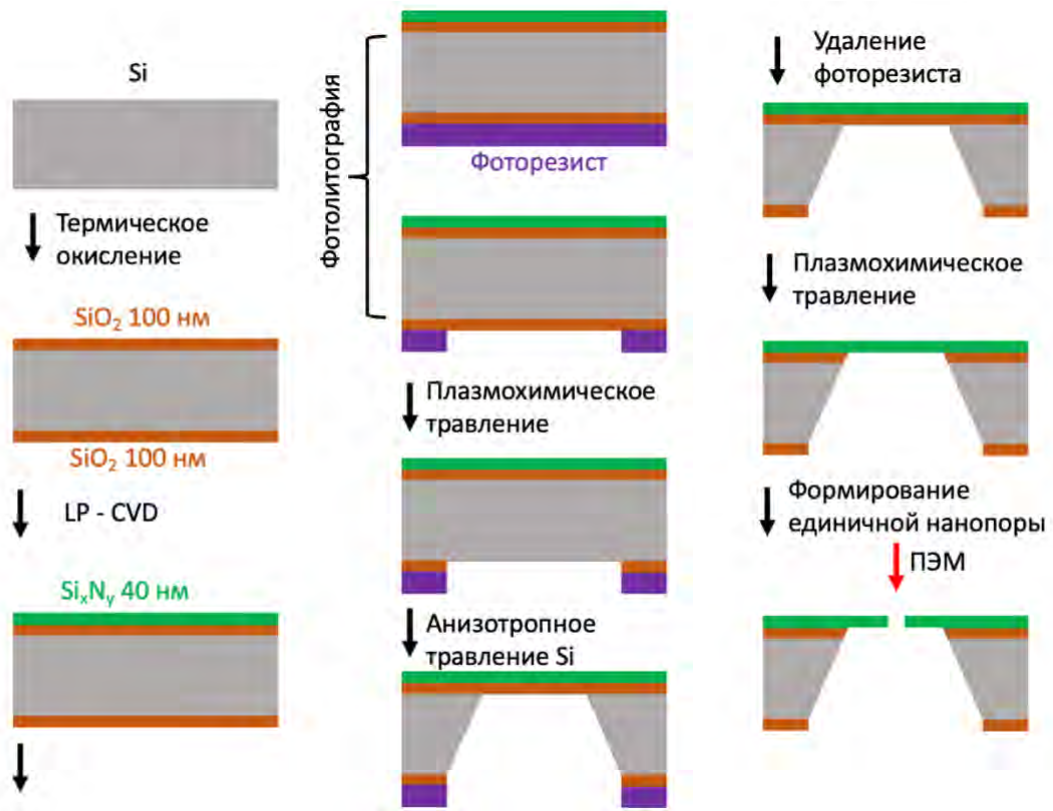


Рисунок 3.1 – Стадии формирования твердотельных нанопор в $\text{Si}_x\text{N}_y/\text{Si}$ мембране

Изготовление нитрид кремниевых мембран осуществлялось в чистой комнате Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук. В ходе технологических исследований удалось изготовить подвешенные мембраны из нитрида кремния толщиной от 20 до 40 нм на кремниевых подложках.

После формирования мембраны с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) посередине мембраны изготавливается нанопора. Нанопоры формировались с помощью ПЭМ в Физико-техническом институте имени А. Ф. Иоффе Российской академии наук. Электронный луч (200 кВ, около 0,5 нА) фокусировался в 2-3 нм области на мембране в течение 10-60 секунд в зависимости от толщины мембраны. ПЭМ обеспечивает контролируемое изготовление нанопор диаметром 5 нм. ПЭМ-изображения нанопор представлены на рисунке 3.2.

Фотографии кремниевой пластины, на каждом из которых расположены 4 свободно-подвешенные мембраны, приведены на рисунке 3.3.

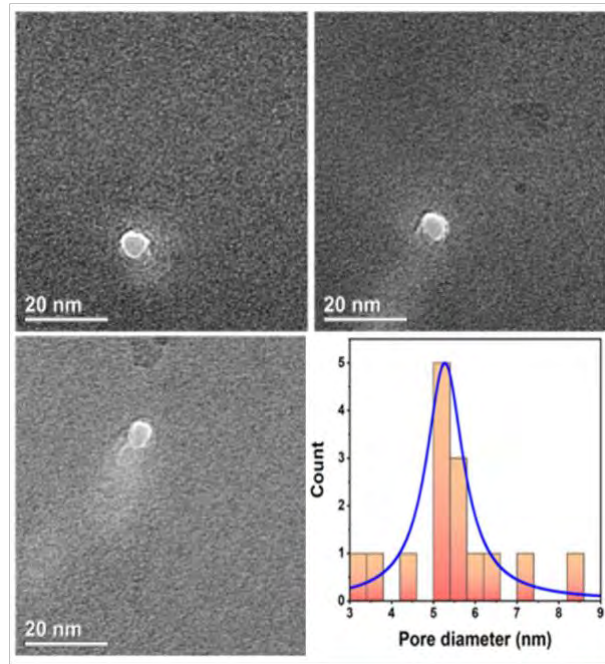


Рисунок 3.2 – ПЭМ изображения трех SiN_x/Si нанопор длиной 40 нм и диаметром ~ 5 нм и распределение диаметров формируемых нанопор по размерам

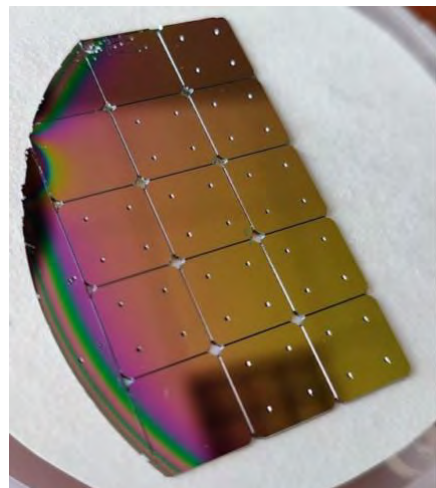
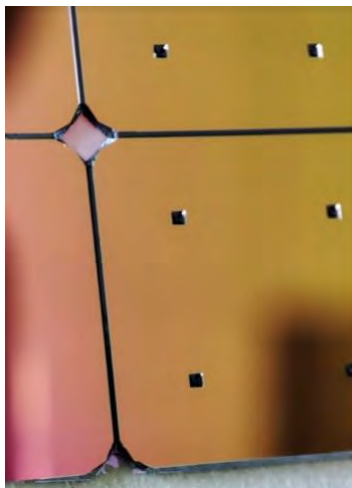


Рисунок 3.3 – Фотография кремниевой пластины с сформированными на ней нанопоровыми чипами. На каждом чипе расположены 4 свободно-подвешенных SiN_x/Si мембраны (квадратные отверстия по углам чипа) с одиночными нанопорами.

3.2 Разработка экспериментальных образцов электрохимической измерительной ячейки

Для экспериментов по изучению ионного транспорта через SiN_x/Si мембрану с одиночной нанопорой были разработаны измерительные электрохимические ячейки разных конфигураций.

Ячейки изготавливались методом фотополимерной 3D-печати на принтере Form 2 (FormLabs, США) из полимера Clear Resin V4. Электрохимическая ячейка представляет собой два независимых *cis*- и *trans*- объема для электролита, между которыми герметично фиксируется мембрана SiN_x/Si толщиной 40 нм с одиночной нанопорой, соединяя тем самым объемы между собой.

В ходе экспериментов выяснилось, что образование пузырьков газа в объеме электролита негативно влияет на возможность исследования транспортных свойств, вплоть до полного перекрытия внутреннего объема нанопоры. Так, основными задачами при разработке ячейки были:

1. Обеспечение герметичности электродов и подвода жидкости.
2. Устранение образования пузырей газа на поверхности мембраны.

На рисунке 3.4а показан прототип ячейки, которая заполнялась с помощью дозатора, поэтому не было возможности устранить пузырь, образующийся около мембраны.

Было предложено техническое решение по дополнительному оснащению ячейки системой отдельных подводящих капилляров к каждому объёму с внутренним диаметром 1 мм (рисунок 3.4б).

В нижней части ячейки было изготовлено оптическое окно из стекла с целью визуального контроля за состоянием мембраны и размещения на предметном стекле микроскопа. Таким образом, можно сфокусироваться на мембране с помощью 50-кратного объектива с фокусным расстоянием не менее 5 мм и наблюдать за процессами на поверхности мембраны.

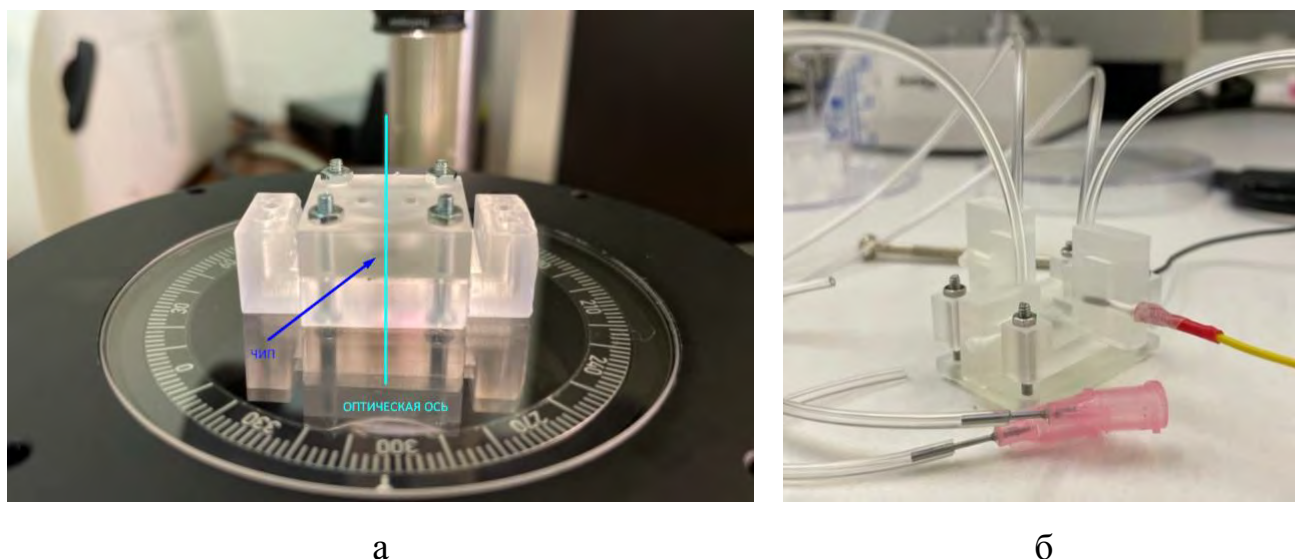


Рисунок 3.4 – Первые варианты электрохимической ячейки с оптическим доступом: а. прототип б. ячейка с подводными капиллярами

С целью улучшения герметизации устройства было предложено снабдить уплотнителями из ПДМС с внешним диаметром 6 мм и внутренним 1 мм отверстия для подвода электродов к раствору. Помимо этого, для обеспечения герметичности системы использовались прокладки из ПДМС с внешним диаметром 6 мм и внутренним 3 мм, которые фиксировали мембрану между *cis*- и *trans*- объемами.

Разработанная конструкция обеспечивает полную герметичность системы, препятствуя загрязнению и образованию пузырей в процессе заполнения ячейки. Габаритные размеры ячейки составляют 35 на 37 мм, внутренние каналы - 2,5 мм, диаметр отверстий, ведущих к мембране, составляет 5 мм. Объем нижней части ячейки составляет 550 мкл, верхней 650 мкл.

На рисунке 3.5 представлена 3D-модель электрохимической ячейки с оптическим доступом. Стрелками показаны отверстия для капилляров, для ПДМС уплотнителей под электроды и для фиксирующих винтов.



Рисунок 3.5 – 3D-модель электрохимической ячейки с оптическим доступом

На рисунке 4.6 изображены экспериментальные образцы электрохимической ячейки с оптическим доступом, изготовленные методом 3D-печати.

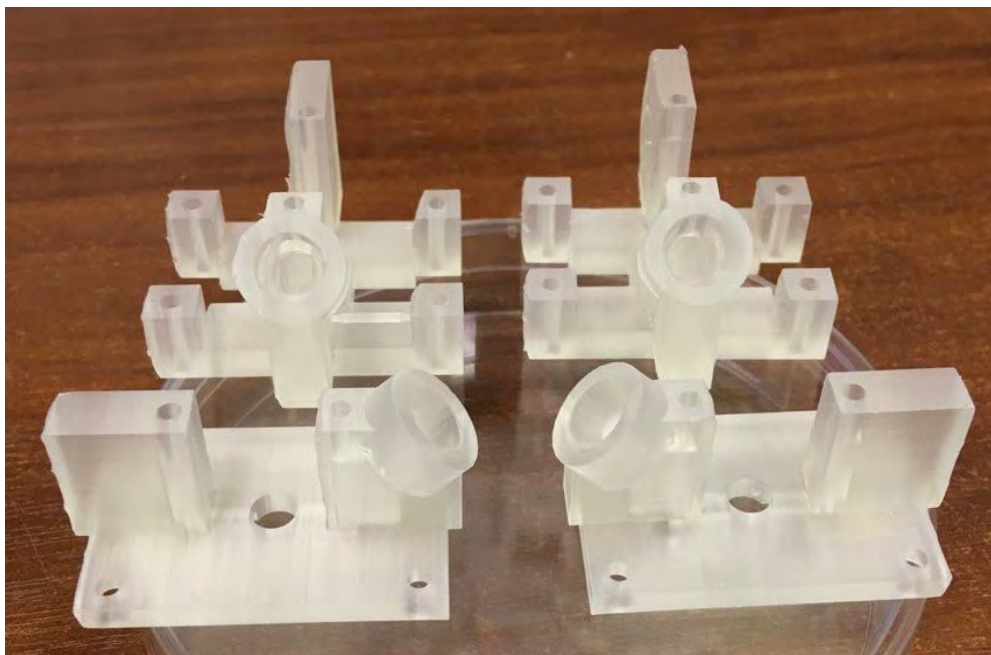


Рисунок 3.6 - Экспериментальные образцы электрохимической ячейки с оптическим доступом, изготовленные методом 3D печати

Оптическое окно в электрохимической ячейке позволило с помощью микроскопа контролировать наличие пузырей перед началом эксперимента. Таким

образом, оптический контроль позволил скорректировать протокол для подготовки образца и ячейки, а также разработать методику измерений для получения воспроизводимых достоверных результатов.

Для дальнейших экспериментов электрохимическая ячейка с оптическим доступом была модифицирована: убрано оптическое окно, а *cis*- и *trans*- объемы перенесены в вертикальную плоскость. На рисунке 3.7 показана 3D-модель такой ячейки. Подвод жидкости к каждому объему реализован также, как в электрохимической ячейке с оптическим доступом, с помощью капилляров с внутренним диаметром 1 мм, для герметичности системы используются прокладки из ПДМС с внешним диаметром 6 мм и внутренним 3 мм. Для подвода электродов к раствору используются уплотнители из ПДМС внешним диаметром 6 мм и внутренним 1 мм. Габаритные размеры ячейки составляют 30 на 21 мм, внутренние каналы 2,5 мм, диаметр отверстий, ведущих к мембране, составляет 5 мм. Объем каждой части электрохимической ячейки составляет 650 мкл.

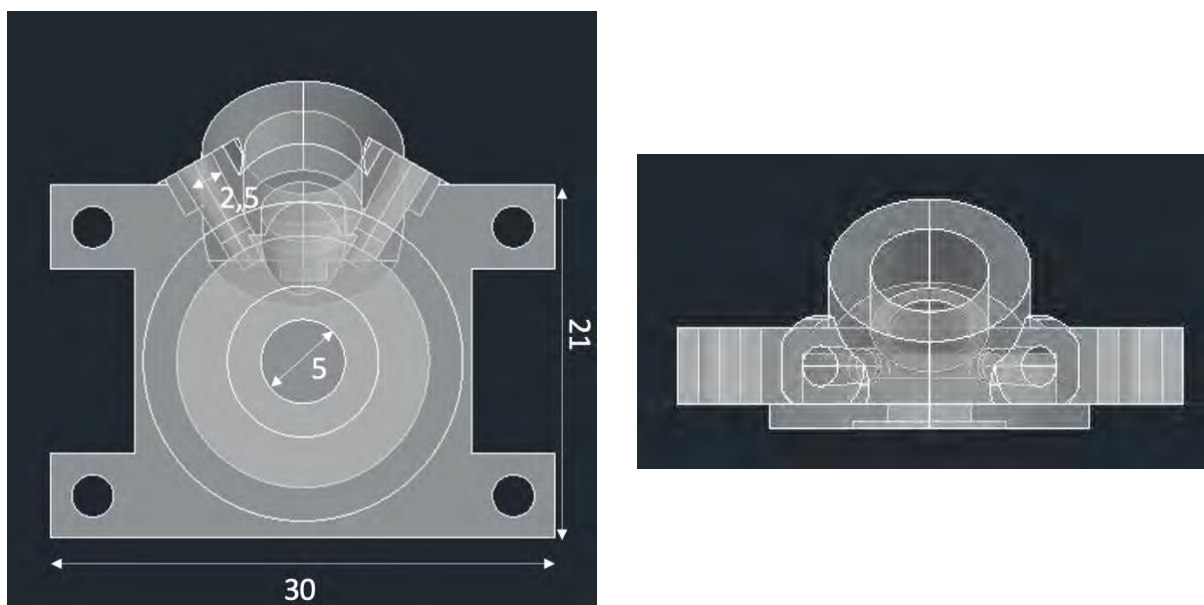


Рисунок 3.7 – 3D-модель электрохимической ячейки

На рисунке 3.8 представлена электрохимическая ячейка в собранном виде с фиксированным образцом между объемами, а также с подведенными электродами и капиллярами.

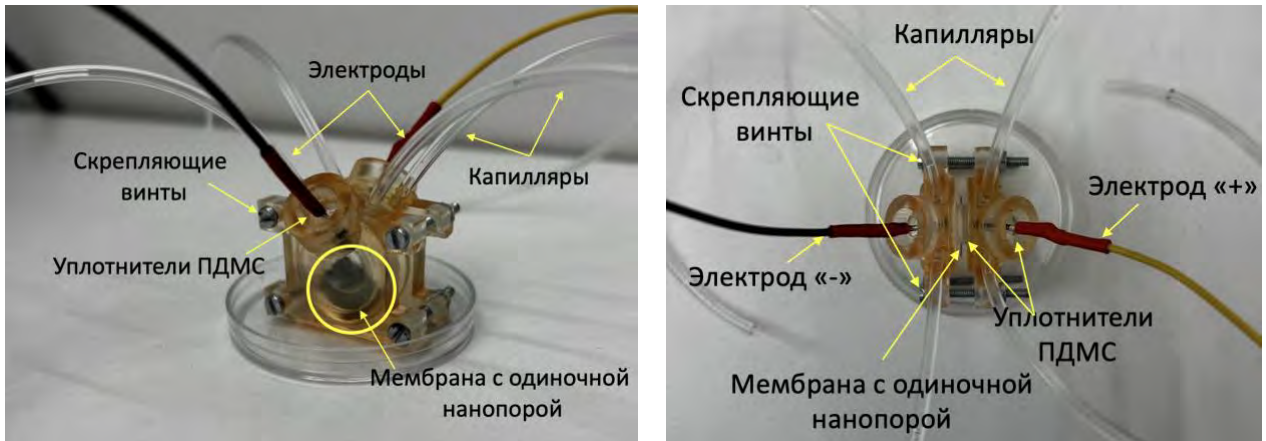


Рисунок 3.8 – Электрохимическая ячейка для биологических экспериментов.

3.3 Протокол подготовки электрохимической ячейки и методика измерений ионного транспорта в SiN_x/Si мембранах с интегрированными нанопорами

Помимо внедренных технических решений для нивелирования негативных эффектов (загрязнение, пузырьки газа) в процессе измерений был разработан и апробирован протокол подготовки электрохимической ячейки и методика эксперимента по изучению механизмов селективного ионного транспорта в твердотельных нанопорах.

Протокол подготовки и заполнения электрохимической ячейки растворами электролита KCl помогли устранить проблемы, негативно влияющие на проведение эксперимента, а также обеспечили получение стабильных измерений.

Все процедуры выполняются исключительно в чистых помещениях.

Требуемое оборудование, компоненты, расходные материалы:

- Шприцы 5, 10 мл (по 5 шт)
- Пинцеты (металлический и фторопластовый)
- Стаканы лабораторные с делением, объем 50мл (5 шт)
- ПДМС (Sylgard 184, Dow Corning, США) прокладки толщиной 2 мм: 2 шт для электродов с внутренним диаметром 1 мм, внешним диаметром 6 мм, 2 шт для прижима образца 3 мм и 6 мм, соответственно.

- Мембранный вакуумный насос LABOPORT UN 86 КТР (или аналогичный), объем потока 5,5 л/мин максимальный вакуум 160 мбар
- Стекланный эксикатор 2-150 мм
- Полипропиленовые пробирки, 15 мл, 10 шт
- Пластина Pt для хлорирования электродов 5 мм на 40 мм, толщиной 1 мм.
- Серебряные проволоки для электродов диаметром 1 мм, длиной 10 мм
- Весы GR-200 (210 г - 0,1 мг) A&D или аналогичные
- Шприцевые фильтры FilterBio® MCE Syringe, материал MCE, диаметр 13 мм, размер пор 0.22 мкм
- Электрохимическая ячейка, изготовленная с помощью 3D-печати на принтере Form 2 (FormLabs) из полимера Clear Resin V4, 1 шт
- Винты M2 x 20 мм для стяжки половинок ячейки, 4 шт
- Дозатор Satorius 100-1000 мкл
- Образец, состоящий из 4 мембран SiN_x/Si с одиночными нанопорами.

Реагенты:

- Калий хлористый KCl (хч), 7,455 г
- Деионизованная (Milli-Q) вода с сопротивлением 18 МОм, 2 л
- Изопропанол 99%, 30 мл
- Серная кислота 93%, 3 мл
- Перекись водорода 37%, 1 мл

Методика:

Подготовка хлор-серебряных электродов (хлорирование):

- С помощью плоского надфиля механически очистить покрытие электродов
- Промыть электроды спиртом
- Протереть насухо

- Подключить электрод (+) и платиновую пластину (-) к источнику напряжения Keithley 2636B
- Поместить электрод и платиновую пластину в стакан, наполненный 1М раствор KCl
- Промыть деионизованной водой
- Включить источник-измеритель Keithley 2636B.
- Запустить программное обеспечение для источника-измерителя Keithley Test script builder и выбрать скрипт «chlore» для измерения воль-амперных характеристик.
- Установить параметры:
- Включить источник напряжения на 300 с, $I_{\min}=0,0005A$ и $I_{\max}=0,00051A$

Подготовка реагентов:

- Для заполнения ячейки необходимо приготовить раствор деионизованной воды смешанный с изопропанолом 1:1.
- Для приготовления 1М KCl необходимо 7,455 г порошка растворить в 100 мл деионизованной воды.
- Для получения всего диапазона концентраций от 10^{-1} до 10^{-4} используется метод последовательного разбавления. Необходимо разбавлять растворы добавляя в 9 мл H₂O 1 мл раствора предыдущей концентрации.
- Все полученные растворы фильтруются через шприцевой фильтр 0,22 мкм.
- Все растворы дегазируются в эксикаторе 30 мин. Дегазировать необходимо не менее двух раз до удаления всех пузырьков газа из раствора. Критерием готовности раствора для заполнения является отсутствие видимых пузырей в объеме раствора и на стенках пробирки.

- Для очистки образца готовится свежий раствор «пираньи»: 3 части концентрированной серной кислоты H_2SO_4 и 1 часть 30% перекиси водорода H_2O_2 .

Очистка мембраны:

- Перед началом работы половинки ячейки, капилляры и ПДМС прокладки промываются в изопропанол, а затем тщательно споласкиваются деионизованной водой.

- Важными условиями при заполнении ячейки без пузырьков газа и получение адекватных экспериментальных данных являются гидрофильность мембраны и отсутствие ее загрязнения. Для гидрофилизации мембраны и удаления органических загрязнений, она помещается в стеклянный стакан в раствор «пираньи» ($30\%H_2O_2+H_2SO_4$, 1:3 объемных долей) на 30 минут.

- Затем, мембрана тщательно промывается деионизованной водой, напор воды должен быть небольшим, чтобы не повредить ее целостность.

- После промывки мембрана оставляется в деионизованной воде на 30 минут.

- По прошествию 30 минут мембрана достается из воды, тщательно промывается водой и слегка просушивается сжатым воздухом (необходимо сдуть видимые капли воды с поверхности), поток сжатого воздуха должен быть почти параллелен плоскости мембраны во избежание повреждений. Критерием чистоты образца является отсутствие видимых загрязнений/разводов на поверхности.

Сборка электрохимической ячейки и установка образца:

- Необходимо герметично вставить промытые капилляры в соответствующие входные и выходные отверстия обеих частей ячейки.

- Затем, в отверстия для электродов вставляются ПДМС уплотнители, с помощью которых осуществляется герметичный подвод электродов к раствору.

- ПДМС прокладка совмещается с нижней частью ячейки, так, чтобы их отверстия совпали, а мембрана с нанопорой кладется сверху лицевой стороной вниз, травильным окном наверх.

- Поверх мембраны устанавливается вторая ПДМС прокладка и верхняя часть ячейки. Все отверстия должны совпадать. Затем части ячейки фиксируются 4 винтами M2x20мм.

Заполнение электрохимической ячейки раствором электролита:

- Свободный конец выходного капилляра погружается в пробирку с раствором IPA+H₂O.
- Входной капилляр с помощью тупоконечной иглы присоединяется к пустому шприцу объема 20 мл.
- Сначала раствором буферного электролита заданной концентрации заполняется нижняя часть ячейки, на разряжение.

При наличии пузыря или воздушного образования в области мембраны, его следует удалить легким щелчком по ячейке. Критерием удачного заполнения часть ячейки является отсутствие пузырей и эффекта линзы в области мембраны.

- Затем необходимо дегазировать ячейку в эксикаторе в течение 5 минут. После дегазации также необходимо встряхнуть ячейку, чтобы убрать все скопившиеся пузыри около мембраны.

- Далее по аналогии заполнить верхнюю часть ячейки и повторно дегазировать 5 минут.

- После выполненных операций обе части ячейки прокачиваются 5 мл деионизованной воды.

- Ввод раствора осуществляется с помощью заполненного шприца 5 мл.

Измерения:

- Поместить собранную ячейку с подведенными капиллярами в клетку Фарадея (металлический бокс).

- Подсоединить электроды к контактам внутри клетки Фарадея соблюдая полярность: на нижнюю подается отрицательное напряжение, на верхнюю – положительное. Закрыть крышку.

- Включить источник-измеритель Keithley 2636B.

- Запустить программное обеспечение для источника-измерителя Keithley Test script builder и выбрать скрипт «potentiostatic_mode_measurement» для измерения вольт-амперных характеристик.

- Установить параметры: V_{min} и V_{max} от -0,3 до 0,3 В, количество точек 1000, лимит по току 0,1 А, время интегрирования по току 20 мс, время между точками измерения 0,5 с

- Смена раствора осуществляется с помощью заполненного шприца раствором объемом 5 мл.

После измерений:

- Выключить источник
- Извлечь электроды
- Извлечь ячейку из клетки
- Удалить раствор электролита шприцом
- Разобрать ячейку и тщательно промыть деионизованной водой, просушить сжатым воздухом
- Тщательно промыть чип водой.
- Промыть и высушить ПДМС прокладки и половинки ячейки.

На рисунке 3.9 представлена фотография собранной и заполненной ячейки, расположенной на столике оптического микроскопа Horiba LabRAM HR800 UV-vis-NIR.

Оптическое окно ячейки позволяет с помощью микроскопа контролировать отсутствие пузырей перед началом экспериментов. Рисунок 3.10 показывает изображение мембраны внутри электрохимической ячейки с оптическим доступом. Видно, что на мембране отсутствуют воздушные пузыри. Для фокусировки на мембране использовался объектив 50X, имеющий фокусное расстояние 5 мм.

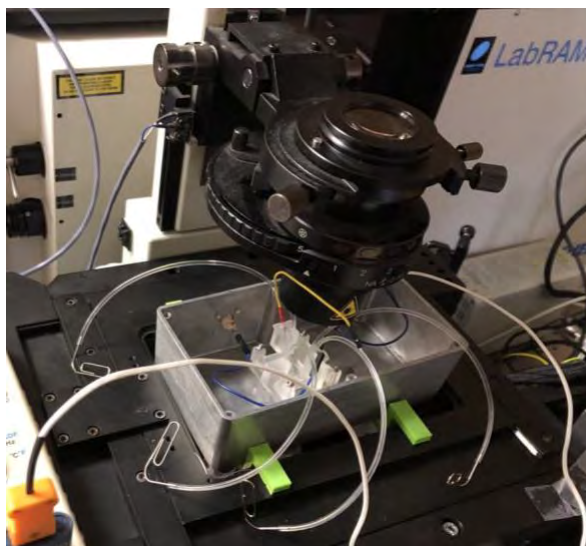


Рисунок 3.9 – Электрохимическая ячейка с оптическим доступом, расположенная на столике инвертированного оптического микроскопа

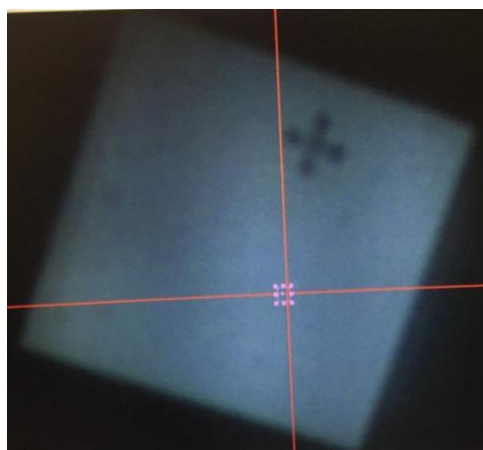


Рисунок 3.10 – Изображение мембраны внутри электрохимической ячейки с оптическим доступом, полученное с помощью микроскопа, подтверждающее отсутствие пузырьков газа в ячейке.

Главным критерием удачно заполненной ячейки является получение стабильных измерений. Так, на рисунке 3.11 показана потенциостатическая зависимость ($V=0.2\text{В}$) при использовании электролита $\text{KCl}+\text{IPA}$ 1:1 концентрации 10^{-2} М. Изопропанол использовался для повышения смачиваемости поры при заполнении. Низкий ток и сильный шум свидетельствуют о наличии в ячейке пузыря. Напротив, рисунок 3.12 показывает типичную потенциостатическую

кривую, ток со временем выходит на постоянный уровень, его величина при заданной концентрации соответствует нанопоре диаметром 5 нм.

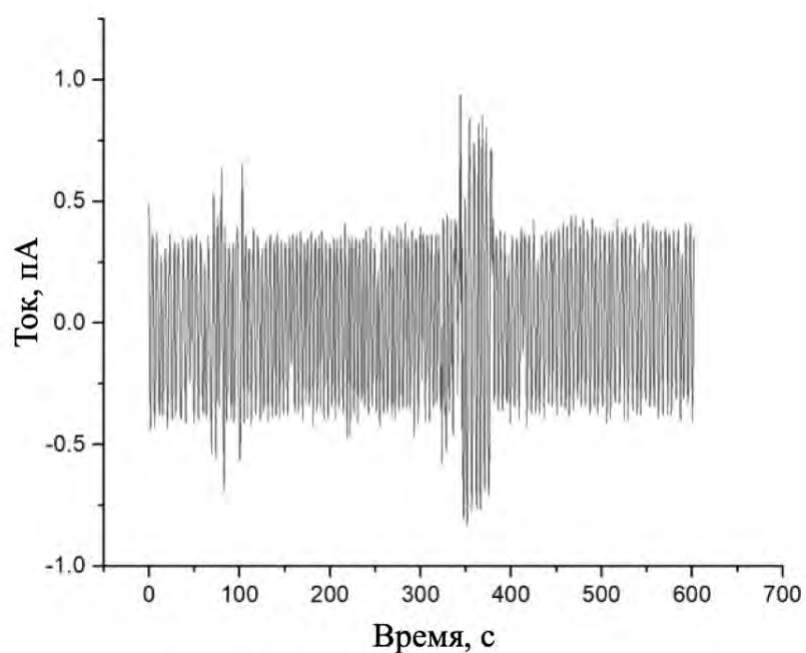


Рисунок 3.11 – Потенциостатические измерения $I(t)$, электролит KCl+IPA 1:1 концентрации 10^{-2} М при присутствии пузырька газа вблизи мембраны.

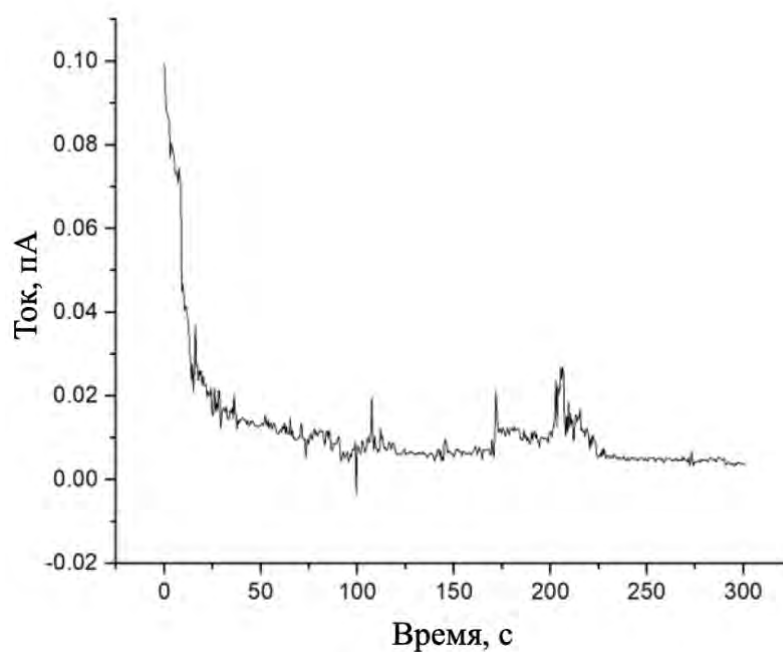


Рисунок 3.12 – Потенциостатические измерения $I(t)$, электролит KCl+IPA 1:1 концентрации 10^{-2} М в ячейке без пузырьков газа.

3.4 Исследования ионного транспорта в SiN_x/Si мембранах с нанопорами

Стенки нанопор электрически заряжены, как и исследуемые молекулы, поэтому такие характеристики как проводимость пор, поверхностный заряд и геометрия стенок влияют на транспорт молекул через нанопоры. Известно, что с уменьшением диаметра пор двойной электрический слой (ДЭС) на границе раздела между внутренней поверхностью поры и электролитом начинает вносить значительный вклад в ионную проводимость. Таким образом, изменяя плотность поверхностного заряда внутренней поверхности нанопоры, можно регулировать ионную проводимость.

Были проведены эксперименты для исследования ионной проводимости нанопоры. В качестве образца выступали мембраны толщиной 40 нм с одиночной нанопорой диаметром 5 нм. Схема эксперимента показана на рисунке 3.13.

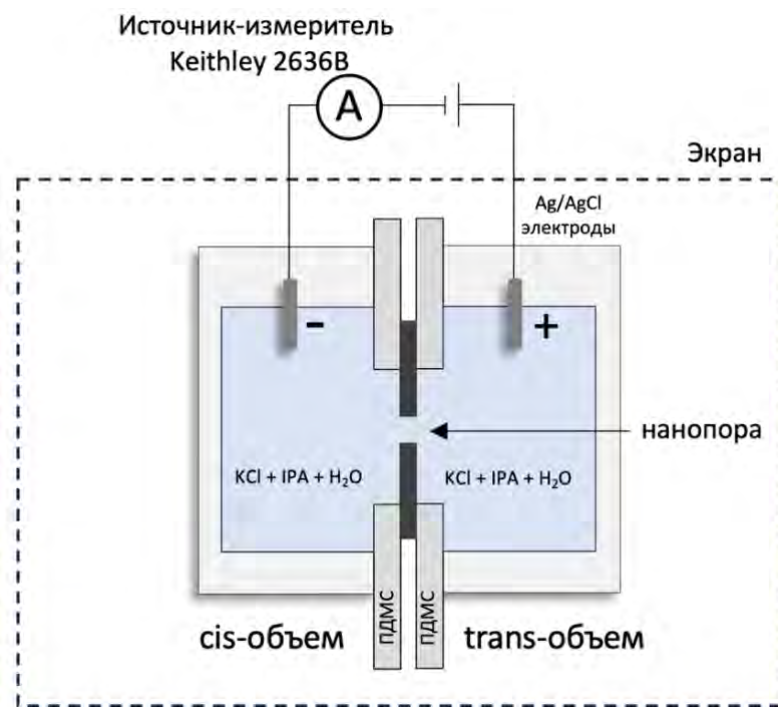


Рисунок 3.13 – Схема эксперимента.

Используя протокол (раздел 3.3), электрохимическую измерительную ячейку заполняли водным раствором хлорида калия заданной концентрации (от 0,1 мМ до 1М), смешанным с изопропанолом (IPA) 1:1 для повышения смачиваемости. Перед

измерениями ячейку помещали в металлический короб (клетку Фарадея). Для измерений использовались электроды Ag/AgCl, рабочая поверхность которых обновлялась путем хлорирования серебряных проволок в 1 М растворе KCl.

Для определения ионной проводимости поры были измерены ВАХ системы в потенциостатическом двухэлектродном режиме с помощью источника-измерителя Keithley 2636В. При измерении на приборе выставлялись следующие параметры: начальное и конечное напряжения от -0,3 до 0,3 В, количество точек 1000, лимит по току 0,1 А, время интегрирования по току 20 мс и время между точками измерения 0,5 с. Ток измерялся в течение 8 мин для каждой точки ВАХ.

Полученные значения зависимостей тока от времени (рисунок 3.14) для каждой точки усреднялись и строились ВАХ (рисунок 3.15). Кривая зависимости тока от времени может отражать процессы открытия и закрытия поры, так на рисунке 3.14 для 0,3В на 180 с происходит скачок величины тока, связанный со смачиванием и переходом нанопоры в открытое состояние. Типичная кривая ВАХ для нанопоры имеет линейный характер, что свидетельствует о хорошей смачиваемости поры (рисунок 3.15).

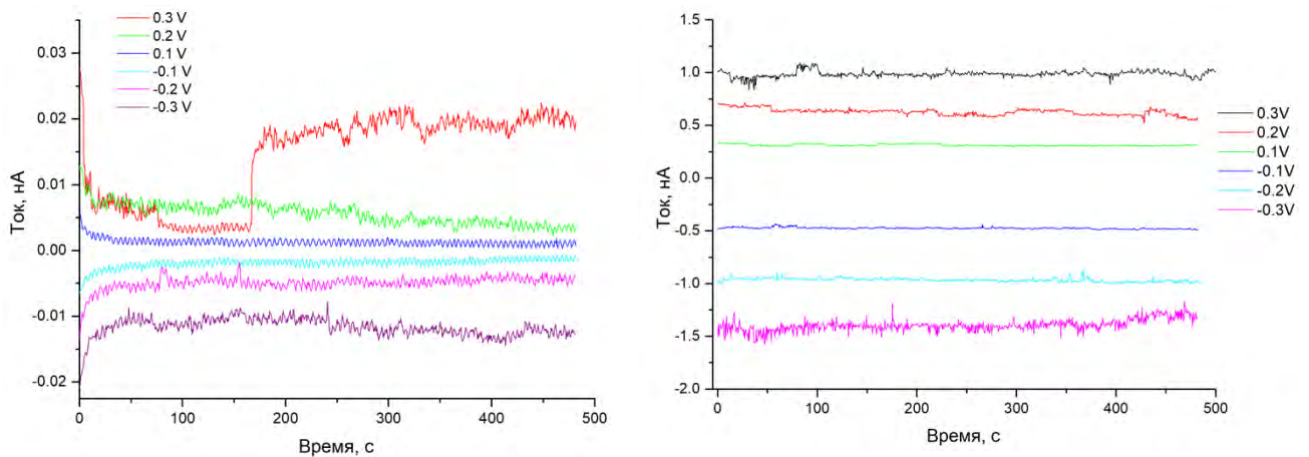


Рисунок 3.14 – Типичные зависимости тока от времени для концентрации KCl 10^{-4} М (слева) и 1 М (справа)

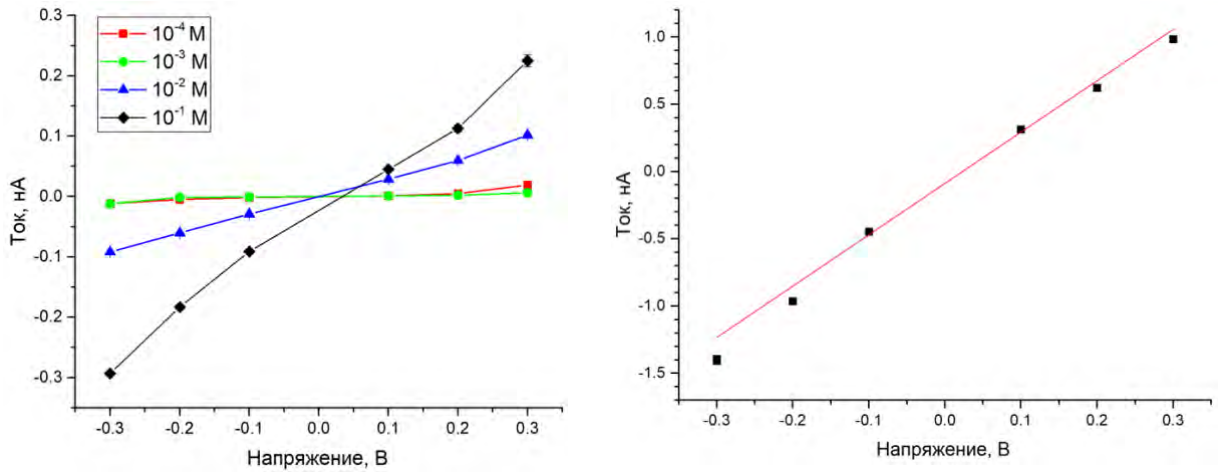


Рисунок 3.15 – ВАХ одиночной нанопоры для концентраций KCl 10^{-4} М- 10^{-1} М (слева) и 1 М (справа), линейная аппроксимация уравнением

$$I(U) = -8.7 \cdot 10^{-11} + 3.8 \cdot 10^{-9}U, R^2 = 0,99257$$

На основании полученных данных были определены значения электропроводности нанопор путем оценки наклона кривых ВАХ для всего диапазона концентраций от 0,1 мМ до 1М. Зависимость проводимости нанопоры от концентрации электролита KCl для двух разных пор показана на рисунке 3.16. Все измерения были проведены на двух разных образцах.

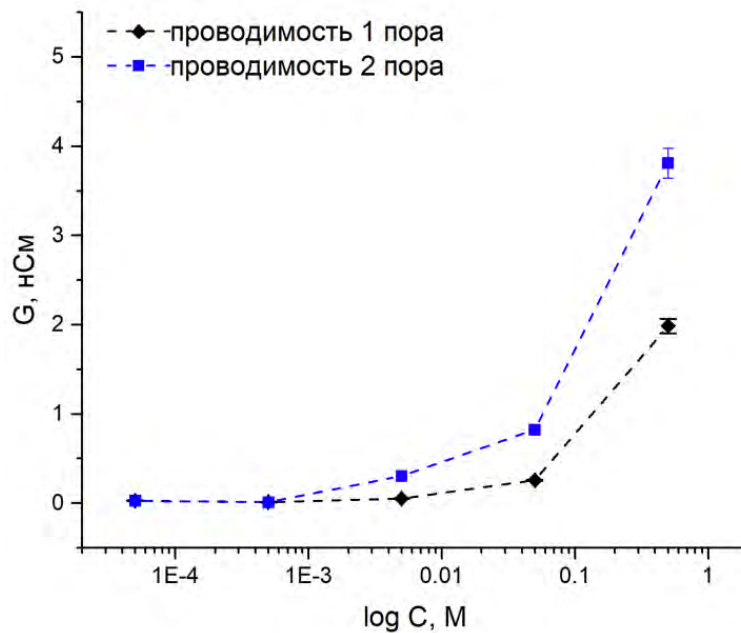


Рисунок 3.16 – Экспериментальная зависимость проводимости нанопоры от концентрации электролита KCl для двух разных пор

Удельная проводимость была рассчитана по формуле 1.9. Как показано на рисунке 3.17, для диапазона концентраций 0,1–10 мМ удельная проводимость σ практически не изменяется и остается на уровне 0,06 См/м. При концентрациях 0,01–1 М проводимость увеличивается с увеличением концентрации, в то время как при значении 1 М удельная проводимость достигает 7 См/м. Этот эффект может быть объяснен перекрытием ДЭС на стенках нанопоры. При низких концентрациях ДЭС его толщина превышает диаметр поры (на порядок). Таким образом ДЭС противоположных стенок перекрывает транспортный канал, создавая непрерывную заряженную область в нанопоре, влияя на ее транспортные свойства. Это объясняет отсутствие влияния концентрации электролита на проводимость при относительно низких концентрациях. При высоких концентрациях толщина ДЭС уменьшается для 1М и 100мМ $\lambda_{\text{ДЭС}} = 0,3$ нм и 1 нм, соответственно, и перекрытие исчезает, что приводит к увеличению электропроводности, делая поведение электролита похожим на поведение объемного раствора.

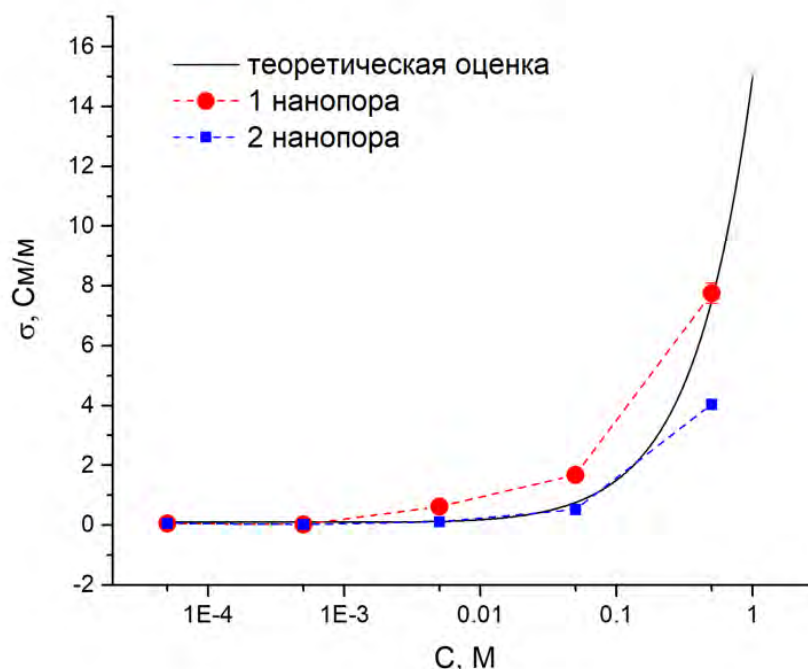


Рисунок 3.17 – Теоретическая оценка и экспериментальные зависимости удельной проводимости нанопоры от концентрации электролита KCl для двух разных пор

Удельная проводимость σ второй поры в диапазоне концентраций 0,1–10 мМ также не изменяется и остается на уровне 0,06 См/м, а при значении 1 М удельная проводимость достигает 4 См/м.

Измеренные значения проводимости согласуются с теоретическими оценками проводимости для поры диаметром 5 нм в мембране 40 нм. Небольшое различие в значениях для двух пор может быть объяснено тем фактом, что измерения электропроводности проводились на разных образцах. Эффективный диаметр пор при концентрации 1М, рассчитанный с помощью формулы 1.7, составил ~5 нм, что хорошо согласуется с результатами ПЭМ-измерений.

Исследования ионного транспорта показали нелинейную зависимость проводимости поры от концентрации электролита из-за изменения конфигурации ДЭС на стенках поры. Этот эффект указывает на возможность изменения селективности поры в зависимости от концентрации электролита.

3.5 Заключение к 3 главе

Изготовлены твердотельные нанопоры диаметром 5 нм в свободно-подвешенной мембране SiN_x/Si толщиной 40 нм с помощью ПЭМ, при этом обеспечивается контролируемое и воспроизводимое изготовление нанопор заданного диаметра.

Разработана и изготовлена электрохимическая ячейка методом фотополимерной 3D-печати на принтере Form 2 из полимера Clear Resin V4. Внедрены технические решения, обеспечивающие полную герметичность системы, препятствуя загрязнению и образованию пузырей газа в процессе заполнения. Подвод жидкости осуществлен с помощью капилляров, для фиксации мембраны с нанопорой между объемами и для подвода электродов к раствору используются уплотнители из ПДМС. Прототип ячейки оснащен стеклянным окном для оптического доступа к мембране с помощью инвертированного оптического микроскопа. Изготовленная ячейка позволяет использовать объектив 50х, имеющий рабочее расстояние не менее 5 мм. Другой вариант

электрохимической ячейки объемом 1300 мкл имеет вертикальное исполнение, позволяющее проводить исследования биологических проб (растворы нуклеиновых кислот, белков).

Разработаны протокол подготовки электрохимической ячейки и методика проведения эксперимента по изучению механизмов селективного ионного транспорта в твердотельных нанопорах, исключающие образование пузырьков газа, мешающих получению достоверных экспериментальных данных. Ключевыми моментами являются фильтрация и дегазация раствора, очистка мембраны с помощью раствора «пираньи» ($30\% \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$, 1:3 объемных долей) для повышения гидрофильности, а также использование электролита, смешанного с изопропанолом для повышения смачиваемости системы при наборе раствора.

Исследована ионная проводимость изготовленных нанопор. Измерены значения тока, проходящего через нанопору для электролита KCl в диапазоне концентраций 10^{-4} –1М. Согласно полученным данным с увеличением концентрации KCl выше 10^{-2} М удельная проводимость нанопор увеличивается и достигает значения 7 См/м при концентрации 1 М. Эта зависимость (в области малых концентраций KCl) может быть объяснена перекрытием двойного электрического слоя, что приводит к появлению заряженной области внутри нанопоры. Так, перекрытие ДЭС создает непрерывную заряженную области нанопоры, влияя на ее транспортные свойства. Определен эффективный диаметр пор при концентрации 1М, он равен 5 нм, что хорошо согласуется с результатами ПЭМ-исследования. Нелинейная зависимость удельной проводимости нанопор от концентрации электролита KCl, обусловленная распределением двойного электрического слоя на стенках поры, указывает на возможность изменения селективности поры в зависимости от концентрации электролита.

4 Экспериментальные исследования: выделение и обнаружение нуклеиновых кислот в пробе

Выделение НК из пробы и их очистка являются важными стадиями для последующего анализа как с использованием методов ПЦР-РВ, так и с использованием технологий секвенирования. Существуют разные методы выделения НК, но одним из наиболее распространенных и перспективных, с точки зрения автоматизации процесса, является выделение НК на магнитных частицах. С целью изучения возможности автоматизации данного процесса и оценки достигаемой эффективности выделения были проведены следующие исследования.

4.1 Пробоподготовка. Микрофлюидный чип для выделения НК

Для экспериментальных исследований использовался упрощенный вариант устройства – микрофлюидный чип с реакционной камерой и длинным каналом, изготовленный методом «мягкой» литографии из ПДМС (рисунок 4.1)

Ввод, перемешивание и удаление жидкости в реакционной камере микрочипа осуществлялись с использованием шприцевого насоса Harvard PHD 2000 (США), управляемого программным обеспечением LabVIEW real-time interface system, и подводящих силиконовых трубок с внутренним диаметром 1,15 мм. Для экспериментов использовался набор реагентов "М-Сорб-ООМ" (ООО «НПФ Синтол», Россия), предназначенный для извлечения ДНК/РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды с помощью магнитных частиц. Биологический образец представлял собой раствор, содержащий известную концентрацию фрагмента кДНК гена GAPDH. После выделения ДНК нуклеиновые кислоты анализировали методом ПЦР-РТ на приборе АНК-32 (ИАП РАН, Россия). Для экспериментов использовали набор специфических праймеров (DNA Synthesis, Россия) и реакционную смесь М-428 "PCR-Mix" (ООО «НПФ Синтол», Россия). Для сравнения эффективности выделения НК в МФЧ было проведено ручное выделение по стандартному протоколу в полипропиленовых пробирках.

Лизис проводили в соответствии с инструкцией производителя: смесь модельного образца кДНК, лизирующего раствора и лизирующего компонента в

полипропиленовых пробирках инкубировали в течение 15 минут при 65°C. Полученный раствор лизата разделяли на две равные части для извлечения нуклеиновых кислот в МФЧ и в полипропиленовых пробирках соответственно.

К каждой части раствора добавляли магнитные частицы и осаждающий раствор для сорбции нуклеиновых кислот. Смесь лизата с магнитными частицами прокачивали несколько раз через реакционную камеру МФЧ со скоростью потока 50÷100 мкл/мин. С помощью внешнего постоянного магнита, расположенного под МФЧ, магнитные частицы с нуклеиновыми кислотами удерживались в реакционной камере. После удаления раствора из чипа магнитные частицы с сорбированной кДНК отмывали от компонентов лизирующего раствора, как показано на схеме на рисунке 4.1. Для этого использовались промывочные растворы из набора реагентов, каждый из которых последовательно прокачивали через реакционную камеру три раза в обоих направлениях в автоматическом режиме. В то же время движение внешнего магнита обеспечивало перемешивание магнитных частиц внутри МФЧ. Затем реакционную камеру с магнитными частицами продували воздухом в течение 5 минут для удаления остатков промывочных растворов. Для десорбции кДНК 50 мкл элюирующего раствора многократно (десять раз) прокачивали через реакционную камеру с частицами, а затем заполненный микрочип инкубировали при 65°C в течение 10 минут. Раствор с элюированной кДНК собирали в пробирку.

Вторую часть раствора с лизатом использовали для извлечения ДНК в полипропиленовых пробирках. Для промывки магнитных частиц и десорбции ДНК были взяты те же объемы жидкостей, что и для извлечения в чипе. После ввода каждого раствора содержимое пробирок перемешивали на микроцентрифуге-шейкере до равномерного распределения магнитных частиц и выдерживали в течение короткого времени при комнатной температуре. После этого пробирки центрифугировали, а затем удаляли надосадочную жидкость. Для высушивания остатков промывочного раствора открытые пробирки инкубировали в течение 5 минут при 65°C. Затем добавляли 50 мкл элюирующего раствора, перемешивали и

выдерживали в течение 10 минут при 65°C. Надосадочную жидкость с кДНК собирали в отдельную пробирку.

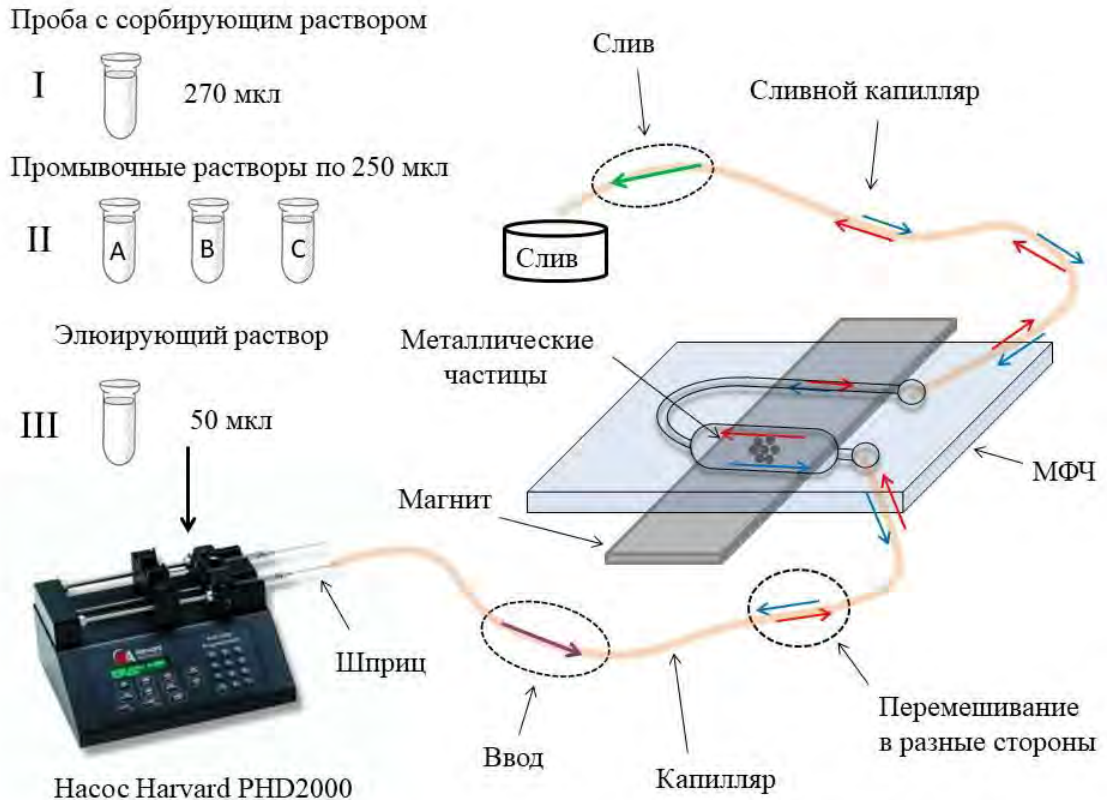


Рисунок 4.1 – Схема выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах в МФЧ

При исследовании эффективности выделения в МФЧ и пробирке использовался метод регистрации количества выделенной НК при проведении ПЦР в реальном времени. К готовой реакционной смеси для ПЦР добавляли объем 2 мкл элюированного раствора кДНК. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду. На рисунке 4.2 показаны кинетические зависимости ПЦР-РВ амплификации для образцов, полученных после экстракции нуклеиновых кислот в микрочипе и в пробирке, а также для исходной модельной кДНК гена GAPDH. Значение порогового цикла (C_t) определялось с помощью программного обеспечения в АНК-32. Среднее значение порогового цикла ПЦР для каждого анализируемого раствора показано в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Среднее значение порогового цикла ПЦР для каждого анализируемого раствора.

Проба	C_t
Выделение ДНК в микрочипе	23,7±0,1 (n=3)
Выделение ДНК в пробирке	23,5±0,1 (n=3)
Исходная концентрация	21,9±0,1 (n=3)

Согласно экспериментальным результатам, эффективность извлечения нуклеиновых кислот в микрофлюидном чипе по сравнению с результатами проведенной ПЦР исходной пробы без выделения составляет $\alpha \approx 28\%$, и в то же время в пробирке (в «ручном» режиме) $\alpha \approx 33\%$, соответственно.

Таким образом, эффективность выделения нуклеиновых кислот на основе магнитных частиц из лизата образца в МФЧ сопоставима с результатами выделения кДНК в пробирках.

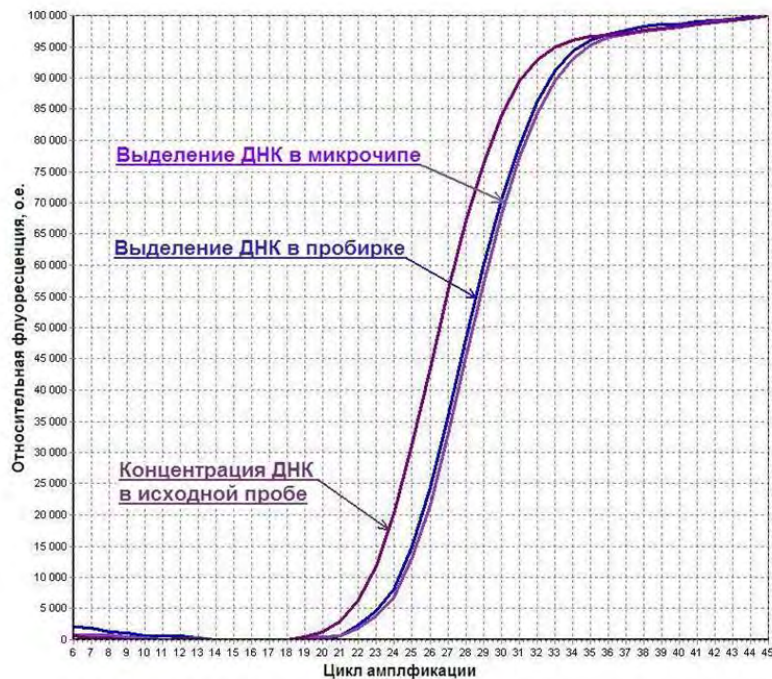


Рисунок 4.2 – Кинетические зависимости амплификации для исходного модельного образца и образцов после выделения ДНК в пробирке и микрочипе

Преимуществом использования микрочипа является возможность автоматизации процесса выделения, низкий расход реагентов по сравнению с традиционным методом, а также проведение всех стадий выделения в герметичном объеме, что важно при анализе ряда патогенов. Кроме того, технология на основе магнитных частиц с использованием МФЧ позволяет избежать стадии центрифугирования, что дает возможность сохранить фрагменты ДНК неповрежденными, а это является преимуществом для последующего секвенирования.

Данный метод выделения НК на магнитных частицах в МФЧ был апробирован и может использоваться для последующего изучения транспорта НК в наноразмерных структурах.

4.2 Исследование возможности детектирования фрагментов ДНК в электрохимической ячейке с одиночной нанопорой в SiN_x/Si мембране

В экспериментах по детектированию фрагментов ДНК, использовалась разработанная электрохимическая измерительная ячейка (раздел 3.1), представляющая собой два независимых *cis*- и *trans*- объема. В ячейку устанавливались Ag/AgCl электроды для проведения измерений по двухэлектродной схеме, а также система капилляров для подачи/отвода буферного раствора электролита. Мембрана с нанопорой герметично фиксировалась в ячейке с помощью эластичных прокладок, соединяя *cis*- и *trans*- объемы электролита. Методика заполнения ячейки подробно описана в разделе 3.2.

В качестве буферного электролита использовался раствор 0,1М KCl и 1 х PBS (1:1 объемных долей), $\text{pH} = 7,4$. Измерения ионного тока проводились с помощью источника-измерителя напряжения и тока, позволяющего реализовывать процесс измерения с частотой 50 кГц. Схема эксперимента изображена на рисунке 4.3.

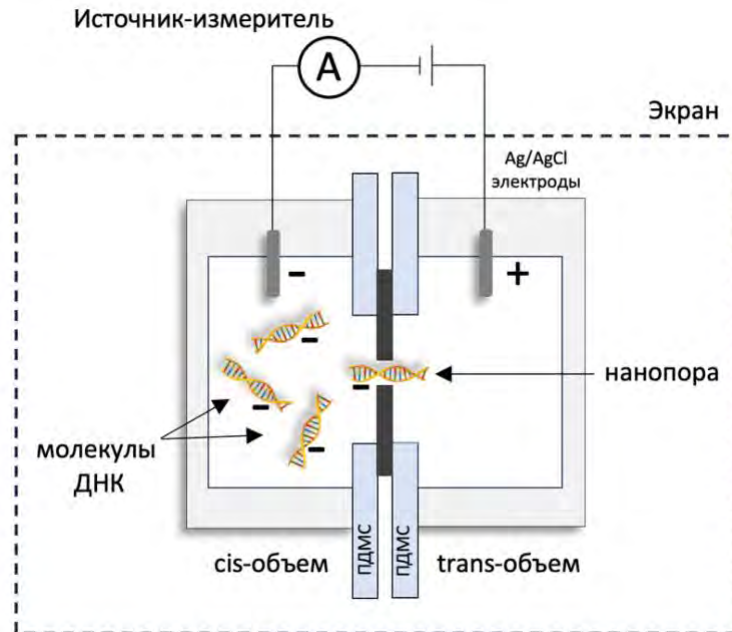


Рисунок 4.3 – Схема эксперимента по детектированию одиночных молекул ДНК

Исследуемыми молекулами в экспериментах выступали двухцепочечные ДНК различной длины: 10000 п.о., 5000 п.о. и 500 п.о (ООО «НПФ Синтол», Россия). Результаты гель-электрофоретического разделения исследуемых фрагментов ДНК приведены на рисунке 4.4.

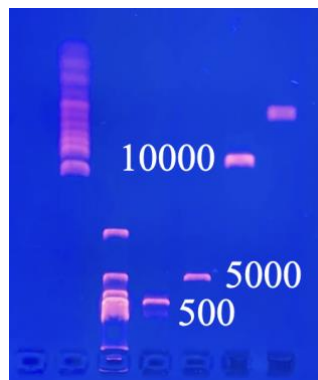


Рисунок 4.4 – Результат гель-электрофоретического разделения исследуемых фрагментов ДНК

Была изучена возможность нанопорового детектирования фрагментов ДНК длиной 10000 п.о. Для этого был проведен эксперимент, направленный на обнаружение транслокаций после добавления фрагментов ДНК в чистый буферный раствор. В первую очередь была проанализирована стабильность ионного тока в

чистом буферном растворе до добавления ДНК. Измерение тока осуществлялось в потенциостатическом режиме (приложенная разность потенциалов фиксирована во времени). На полученной потенциостатической кривой зависимости тока от времени наблюдался уровень тока 245,3 пА при среднеквадратичном отклонении (СКО) 4,9 пА ($U=0,1$ В), что говорит о высокой чистоте раствора, обеспечивающей отсутствие паразитных событий транслокаций. Далее, в объем ячейки, где расположен отрицательно заряженный электрод (*cis*-объем), был добавлен буферный раствор, содержащий фрагменты ДНК длиной 10000 п.о. в концентрации $\sim 0,1$ нг/мкл. Под действием приложенного электрического поля, отрицательно заряженные молекулы ДНК перемещались через нанопору из *cis*- в *trans*- объем. При этом средний уровень ионного тока составил 216,5 пА, при СКО $\sim 4,9$ пА. Были зарегистрированы короткие скачкообразные изменения уровня ионного тока, что говорит о возникновении транспорта фрагментов ДНК через нанопору. Типичное изменение тока, представляющее собой событие транслокации, показано на рисунке 4.5 и характеризуется амплитудой (250 пА) и продолжительностью транслокации (0,1 с).

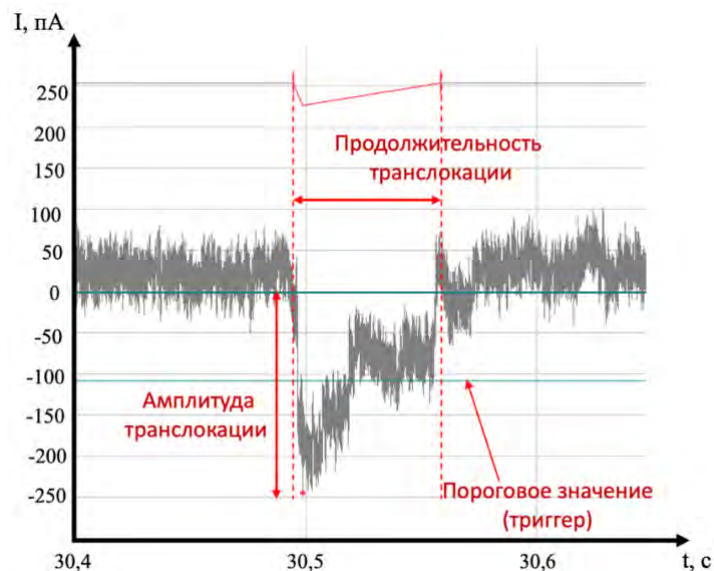


Рисунок 4.5 – Пример события транслокации

На рисунке 4.6 изображены полученные в ходе эксперимента потенциостатические зависимости тока от времени до и после добавления ДНК.

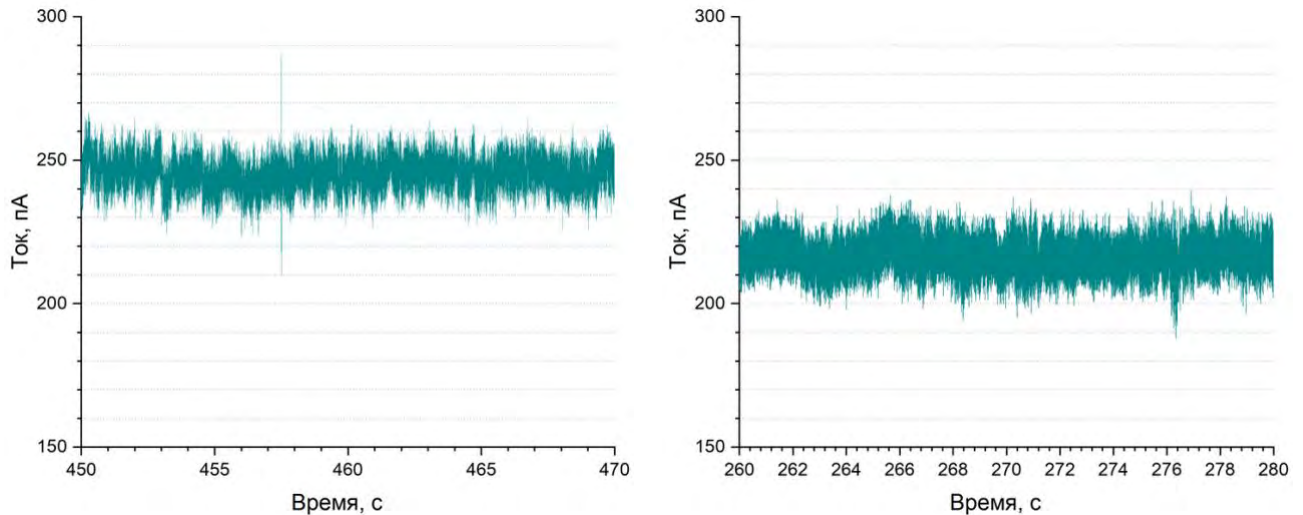


Рисунок 4.6 – Потенциостатические кривые зависимости тока от времени до (слева) и после (справа) добавления ДНК

Затем исследовались зависимости продолжительности событий транслокаций от длины фрагментов ДНК. Измерения были проведены на другом образце SiN_x/Si нанопоры диаметром ~5 нм. Важно отметить, что для каждой длины фрагментов были проведены отдельные эксперименты. Эксперимент был проведен для молекул ДНК длиной 5000 и 500 п.о. в концентрациях 1,25 нг/мкл и 3,3 нг/мкл, соответственно. Для увеличения отношения сигнал/шум, в данном эксперименте было приложено напряжение 0,3 В.

Для идентификации событий транслокаций было необходимо провести анализ результатов нанопорового молекулярного детектирования. С этой целью измеренные зависимости тока от времени были охарактеризованы в три этапа: 1) построение и вычитание базовой линии, 2) поиск событий транслокаций по пороговому значению тока, 3) фильтрация событий и последующий анализ достоверных данных.

Используя ПО Origin (OriginLab Corporation), задавалась базовая линия тока методом (фильтром) Савицкого-Голея [30], принцип действия которого заключается в проведении локальной полиномиальной регрессии вокруг каждой точки (значении тока) и создании нового сглаженного значения для этих точек. Метод Савицкого-Голея позволяет сохранить амплитуду и длительность коротких

событий транслокации, при этом нивелировать влияние длительных изменений уровня тока, связанных с электрохимическими особенностями измерений ионного тока по двухэлектродной схеме. После сглаживания исходной зависимости значение базовой линии вычиталось из текущего значения тока, формируя массив данных, удобный для автоматического поиска событий транслокаций. На рисунке 4.7 изображены потенциостатические кривые зависимости тока от времени до и после добавления ДНК с вычетом базовой линии.

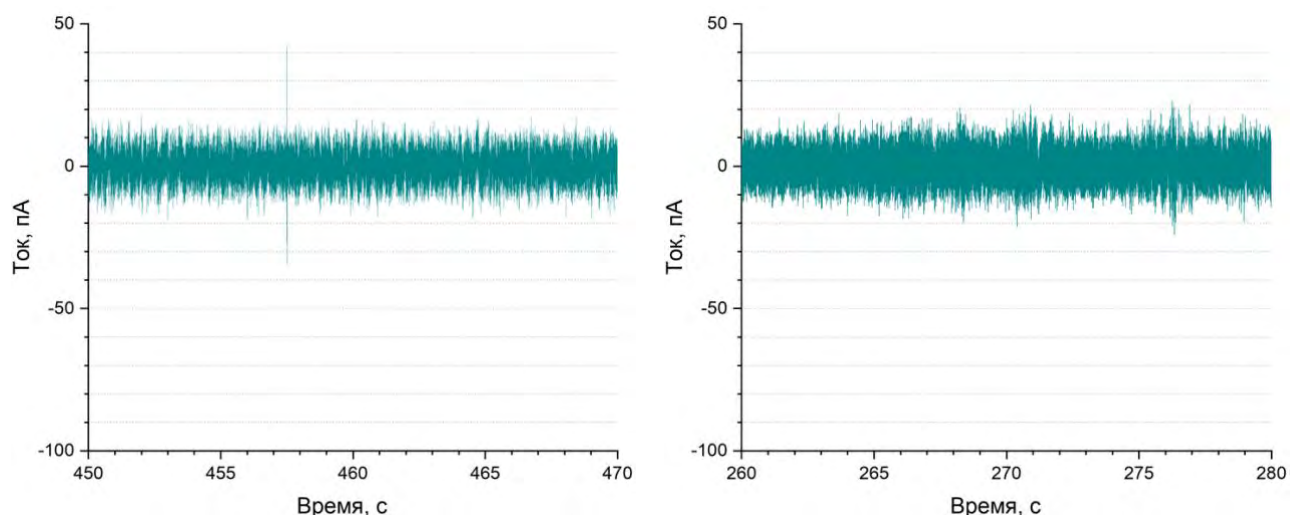


Рисунок 4.7 – Потенциостатические кривые зависимости тока от времени до (слева) и после (справа) добавления ДНК (10000 п.о.) с вычетом базовой линии

На втором этапе, с помощью программы Clampfit (Molecular Devices) [154] производился автоматический поиск событий транслокаций, удовлетворяющих заданным параметрам. Минимально необходимые параметры обнаружения событий включают в себя значения базовой линии и значение триггера (trigger). Поскольку мы исследуем сглаженные данные, значение базовой линии устанавливается равное 0. Триггер – это пороговое значение тока, задаваемое как $I_t = SDx$, где SD - среднеквадратичное отклонение, x - произвольный коэффициент, значение которого влияет на эффективность детектирования событий транслокации. Значение коэффициента было подобрано так, чтобы отсеять большую часть паразитных сигналов, при этом сохранив как можно больше

достоверных событий транслокаций. Исходя из этих соображений нами было выбрано значение $x = 4,5$.

Дополнительные параметры помогают точнее настроить поиск. Значение Re-arm, определяющее окончание события, устанавливалось равным 1 пА, данное значение наиболее близко к значению базовой линии, что необходимо для достоверного определения продолжительности событий. Значение Rejection (отклонение) используется для отсекаания событий большой амплитуды, связанных с внешними наводками и/или артефактами измерений. Дополнительно устанавливались значения пре-триггера (pretrigger) и пост-триггера (post-trigger), помогающие добавить фиксированные участки до и после события для получения информации о форме обнаруженного сигнала. В нашем случае $T_{pretrigger} = T_{post-trigger} = 2$ мс. В результате поиска транслокаций формировался массив данных, содержащий информацию о каждом обнаруженном событии. Параметры поиска события транслокации показаны на рисунке 4.8.

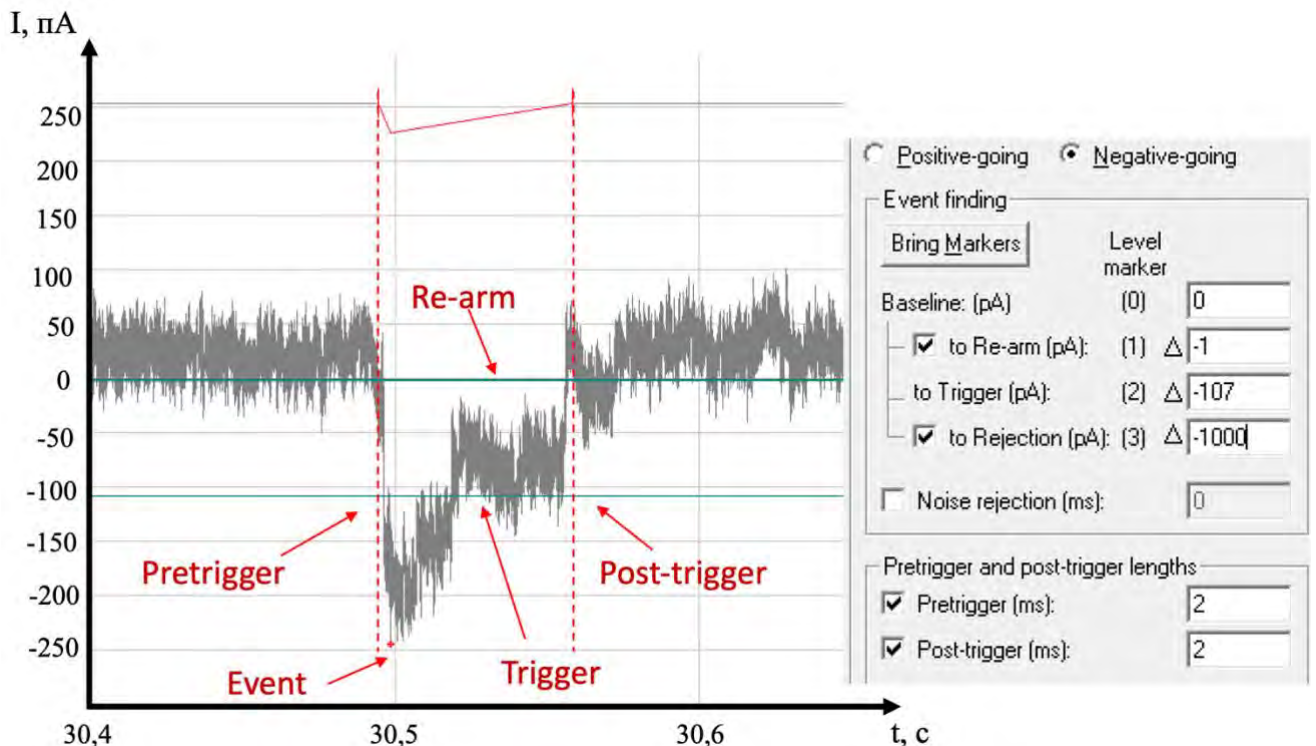


Рисунок 4.8 –Параметры поиска

Третий этап обработки полученных данных представляет собой фильтрацию найденных событий. Для этого вручную удалялись кластеры шумовых событий, а

также автоматически удалялись артефакты поиска и события, удовлетворяющие соотношению $I_{peak} > 2I_{antipeak}$. Такое соотношение необходимо для удаления симметричных событий, являющихся следствием электрических помех.

В ходе анализа событий транслокаций молекул ДНК 10000 п.о. была построена зависимость амплитуды транслокаций от их продолжительности (рисунок 4.9), демонстрирующая возможность одномолекулярного детектирования. Количество событий ДО/ПОСЛЕ добавления ДНК изменилась с 11 событий до 136 событий. Кроме того, события после добавления ДНК характеризуются более продолжительными транслокациями, что может указывать на прохождение через пору крупных молекулярных соединений. Значительный разброс амплитуды и длительности транслокаций для молекул одной длины, по-видимому, может быть связан с различной конформацией молекул или фрагмента молекулы (полностью распутанная и частично запутанная) в момент прохождения через внутренний объем поры.

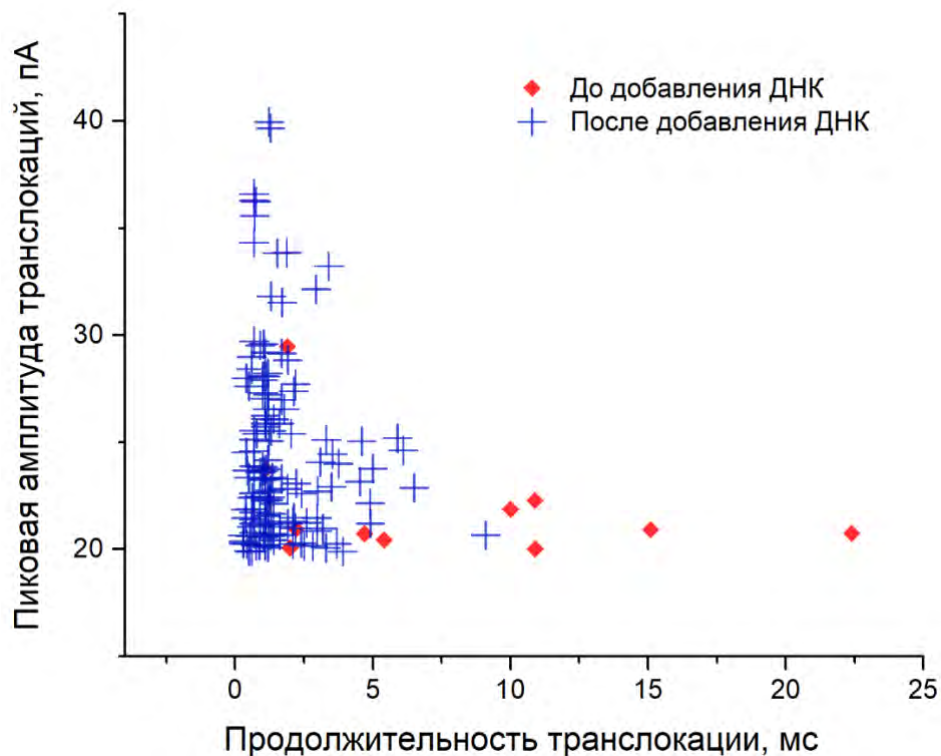


Рисунок 4.9 – Зависимость пиковой амплитуды транслокаций от продолжительности транслокаций для фрагментов ДНК 10000 п.о.

На рисунке 4.10 представлено двумерное распределение плотности транслокаций фрагментов ДНК полученное с помощью метода ядерной оценки плотности (ЯОП, *Kernel Density Estimation*, KDE). Видно, что центр тяжести распределения оказывается в области коротких продолжительностей транслокаций (до 2 мс), что подтверждает природу транслокаций, связанную с перемещением фрагментов ДНК через нанопору под действием электрофоретических сил.

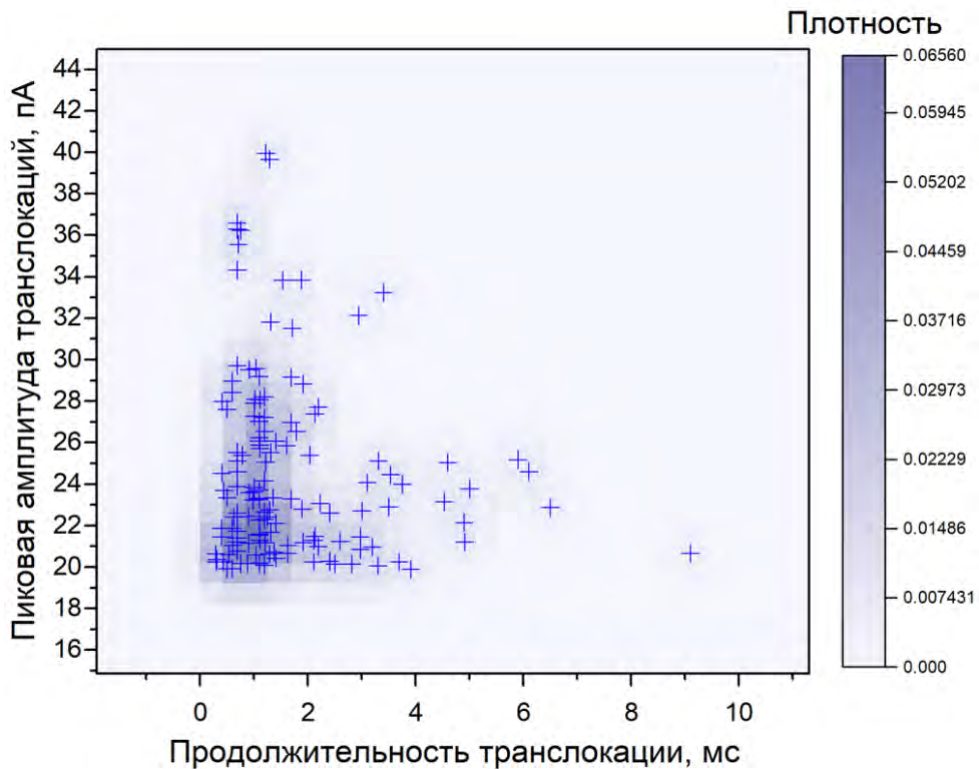


Рисунок 4.10 – Двумерное распределение плотности событий транслокации фрагментов ДНК

Также были проанализированы события транслокаций молекул ДНК длиной в 500 п.о. и 5000 п.о, построена зависимость амплитуды транслокаций от их продолжительности (рисунок 4.11 - 4.12). Увеличение количество событий после добавления ДНК указывает на прохождения молекул ДНК через нанопору.

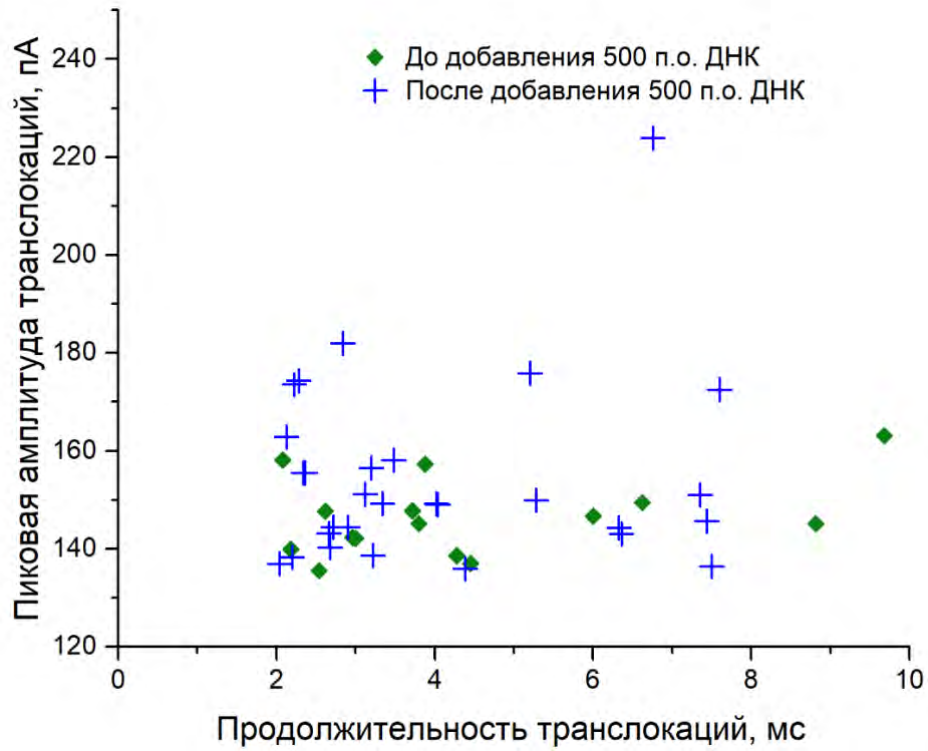


Рисунок 4.11 – Зависимость пиковой амплитуды транслокаций от продолжительности транслокаций для молекул ДНК длиной 500 п.о.

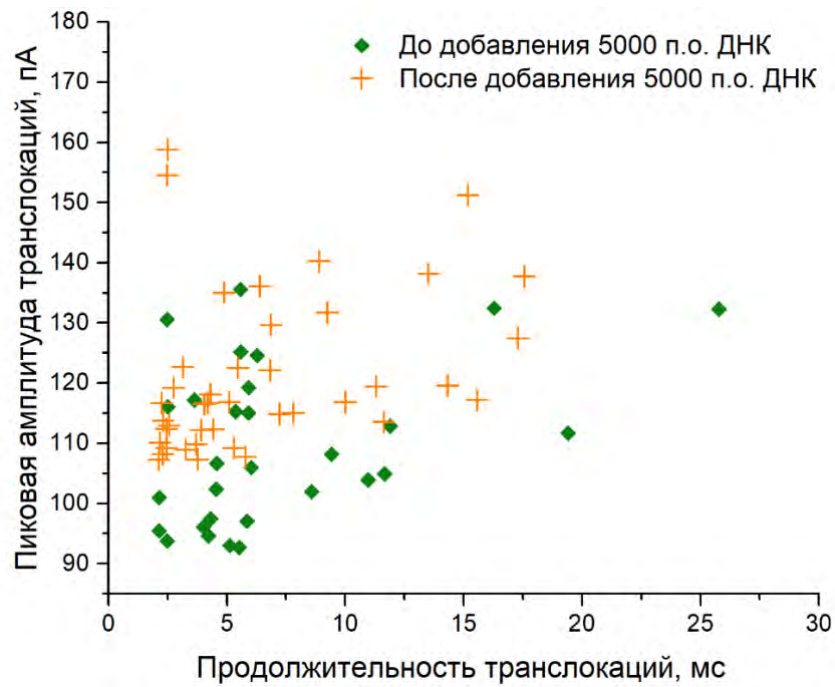


Рисунок 4.12 – Зависимость пиковой амплитуды транслокаций от продолжительности транслокаций для молекул ДНК длиной 5000 п.о.

Анализ данных полученных в ходе эксперимента с фрагментами ДНК длинами 5000 и 500 п.о показал нелинейную зависимость продолжительности транслокаций от длины молекул (рисунок 4.13). Медианное значение времени транслокаций для 5000 и 500 п.о. составило 1,7 мс и 1,09 мс (выборочные средние 3,8 мс и 1,7 мс) соответственно, что соответствует уменьшению времени транслокаций для более коротких молекул на 35%. Это может быть связано с сложным и не до конца изученным механизмом прохождения молекул ДНК через внутренний объем поры, в котором существенную роль играют процессы взаимодействия молекул со стенками поры. Можно предположить, что взаимодействие фрагментов ДНК со стенками нанопоры оказывает доминирующее влияние на длительность транслокаций по сравнению с длиной молекул.

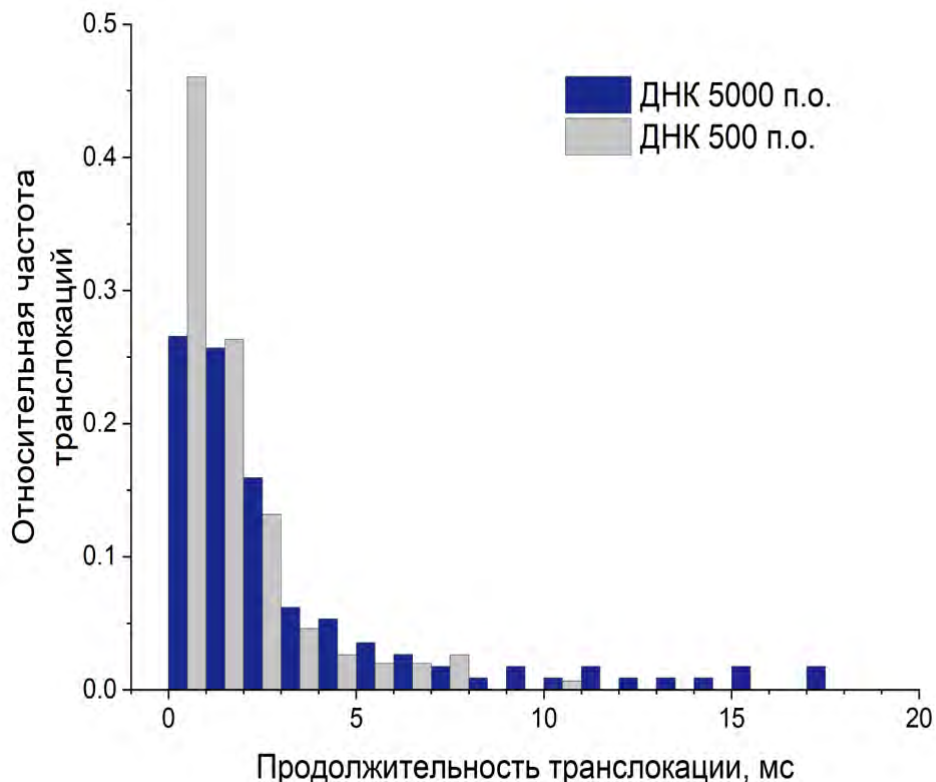


Рисунок 4.13 – Распределение событий транслокаций по продолжительности для молекул ДНК 5000 и 500 п.о.

4.3 Заключение к 4 главе

Исследована эффективность выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах в МФЧ с целью получения очищенного препарата для дальнейших исследований. Эффективность выделения оценена методом ПЦР-РВ в ПДМС чипах в сравнении с выделением в пробирке ($\alpha \approx 28\%$ и $\alpha \approx 33\%$, соответственно). Способ выделения позволяет автоматизировать процесс, устранить влияния человеческого фактора и может использоваться для получения образцов, подходящих для исследования транспорта НК в наноразмерных структурах.

Проведены эксперименты по регистрации фрагментов ДНК длиной 10000, 5000 и 500 п.о под действием электрофореза при их прохождении через твердотельную нанопору. По полученным результатам построена зависимость амплитуды транслокаций от их продолжительности, демонстрирующая возможность одномолекулярного детектирования. Для анализа событий транслокаций использовалась процедура обработки для обнаружения событий по пороговому значению тока. Анализ событий осуществлялся в три этапа: построение и вычитание базовой линии, поиск событий транслокаций по пороговому значению тока, фильтрация событий и последующий анализ достоверных данных. Для фрагментов ДНК 10000 п.о. количество событий после добавления ДНК изменилось с 11 событий до 136 событий. Построено двумерное распределение плотности транслокаций фрагментов ДНК, центр тяжести распределения находится в области коротких продолжительностей транслокаций (до 2 мс), подтверждая природу транслокаций, связанную с перемещением фрагментов ДНК через нанопору под действием электрофоретических сил.

Результаты экспериментов по детектированию фрагментов ДНК 5000 и 500 п.о. свидетельствуют о существовании зависимости длительности событий транслокаций от длины молекулы. Выявлено, что при уменьшении длины молекул в 10 раз, продолжительность транслокаций снижается на 35%. Таким образом продемонстрирована возможность различия фрагментов ДНК по длине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертации получены следующие основные результаты:

1 Разработан и апробирован метод изготовления многоцветного кремний-стеклянного микрофлюидного устройства с наноканалами заданной геометрией и контролируемыми размерами в котором нано- и микро-размерные структуры формируются методами оптической литографии и травлением сфокусированным ионным лучом, а герметизация устройства осуществляется анодным свариванием, что позволяет создавать многоцветные МФУ, обеспечивающие устойчивость к агрессивным средам (некоторые щелочи, серная кислота) и гарантирующие сохранность свойств устройства на срок не менее трех месяцев. Продемонстрирована возможность формирования наноканалов шириной 50 нм, глубиной 10 нм и длиной 10 мкм при минимальном времени травления 10 с, получаемые структуры охарактеризованы методами АСМ и РЭМ.

2 Исследованы транспортные свойства наноканалов в изготовленных микрофлюидных устройствах с помощью модельных растворов электролита KCl в диапазоне концентраций от 0,1 мМ до 0,1 М методом измерения ионной проводимости. Экспериментальные данные аппроксимированы с использованием одномерной теоретической модели с постоянным потенциалом, что позволило оценить эффективный диаметр наноканалов ~ 20 нм и плотность поверхностного заряда внутри канала $1,5$ мКл/м². Подтверждено наличие зарядовой селективности в наноканалах. Исследования с использованием конфокальной оптической микроскопии подтвердили наличие диффузионного потока жидкости через сформированные наноканалы и герметичность устройств. Устройства могут быть основой для создания высокочувствительного биосенсора для обнаружения биомолекул с использованием наноразмерных функциональных структур (в частности, наноканалов), интегрированных в микрофлюидную систему.

3 Разработаны, изготовлены и апробированы варианты электрохимических ячеек со встроенной SiN_x/Si мембраной с нанопорой, методом фотополимерной 3D-печати на принтере Form 2 (FormLabs, США) из полимера Clear Resin V4 (США) в которых внедрены технические решения, обеспечивающие

герметичность системы, препятствуя загрязнению и образованию пузырей газа в процессе заполнения ячейки и проведения эксперимента. Один из вариантов электрохимической ячейки оснащен стеклянным окном для оптического доступа к мембране с помощью инвертированного оптического микроскопа для визуального контроля заполнения ячейки. Другой вариант ячейки имеет вертикальное исполнение, позволяющее проводить исследования биологических проб (растворы нуклеиновых кислот, белков) объемом 1,3 мл.

4 Разработаны протокол подготовки электрохимической ячейки и методика проведения эксперимента по изучению механизмов селективного ионного транспорта в твердотельных нанопорах, исключающие образование пузырьков газа, мешающих получению достоверных экспериментальных данных. Ключевыми пунктами в разработанном протоколе являются порядок проведения процедур фильтрации и дегазации раствора, очистки мембраны с помощью раствора «пираньи» ($30\% \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$, 1:3 объемных долей) для повышения гидрофильности, а также использование электролита, смешанного с изопропанолом для повышения смачиваемости системы. Предложенные решения обеспечили получение стабильных и воспроизводимых результатов.

5 Исследована ионная проводимость одиночных нанопор диаметром 5 нм в свободно-подвешенной SiN_x/Si мембране толщиной 40 нм методом измерения ионной проводимости растворов электролита KCl в диапазоне концентраций 0,1 мМ до 1 М. Согласно полученным данным с увеличением концентрации KCl выше 10^{-2} М удельная проводимость нанопор увеличивается и достигает значения 7 См/м при концентрации 1 М. Эта зависимость имеет нелинейный характер и может быть объяснена перекрытием двойного электрического слоя, возникающего на стенках пор, что приводит к появлению заряженной области внутри нанопор, влияя на ее транспортные свойства и позволяя изменять селективность поры в зависимости от концентрации электролита. Оценен эффективный диаметр нанопоры при 1М раствора KCl составил 5 нм, что хорошо согласуется с результатами ПЭМ-исследований.

6 Исследована эффективность выделения НК на магнитных частицах в микрофлюидном чипе из ПДМС в сравнении с «ручным» выделением. Показано, что эффективность извлечения нуклеиновых кислот в микрофлюидном чипе по сравнению с исходным продуктом (ДНК) составляет $\alpha \approx 28\%$, при «ручном выделении» $\alpha \approx 33\%$, соответственно. Преимуществом использования МФЧ является возможность автоматизации процесса выделения, низкий расход реагентов по сравнению с традиционным методом, а также проведение всех стадий выделения в герметичном объеме, что важно при анализе ряда патогенов. Применение магнитных частиц позволяет сохранить фрагменты ДНК неповрежденными, а это является преимуществом для последующего секвенирования.

7 Продемонстрирована возможность детектирования отдельных молекул ДНК с помощью твердотельной нанопоры по изменению ионного тока. Для анализа транслокации фрагментов ДНК через нанопору использована процедура, заключающаяся в обнаружения событий по пороговому значению тока. Проведены эксперименты по детектированию фрагментов ДНК длиной 10000, 5000 и 500 п.о. По полученным результатам построена зависимость амплитуды транслокаций от их продолжительности, демонстрирующая возможность одномолекулярного детектирования. Для образца ДНК 10000 п.о. количество событий изменилось с 11 событий до 136 событий после добавления ДНК. Продемонстрирована зависимость длительности событий транслокаций от длины молекулы. Из полученных данных следует, что при уменьшении длины молекул в 10 раз, продолжительность транслокаций снижается на 35%.

По результатам работы опубликованы следующие статьи:

1. **Afonicheva P.K.**, Esikova N.A., Tupik A.N., Evstrapov A.A. Magnetic beads-based nucleic acids extraction in microfluidic chip // Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing, 2019. Vol. 1400, №. 3. P. 033012.

2. **Afonicheva P.K.**, Zubik A.N., Bulyanitsa A.L., Rudnitskaya G.E., Evstrapov A.A. Multichamber hybrid microfluidic chips for nucleic acids detection by qPCR assay // Journal of Physics: Conference Series (JPCS), 2020. Vol. 1695. P. 012060.
3. Lebedev D., Malyshev G., Ryzhkov I., Mozharov A., Shugurov K., Sharov V., Panov M., Tumkin I., **Afonicheva P.**, Evstrapov A., Bukatin A., Mukhin I. Focused ion beam milling based formation of nanochannels in silicon-glass microfluidic chips for the study of ion transport // Microfluidics and Nanofluidics, 2021. Vol. 25, №. 6. P. 1-10.
4. **Afonicheva P.K.**, Lebedev D.V., Bukatin A.S., Mukhin I.S., Evstrapov A.A. Creation of micro- and nanochannels on the surface of silicon chips by lithography methods and investigation of ion transport in channel // Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2021. Vol. 2103, №. 1. P. 012112.
5. Koryakina I. G., **Afonicheva, P. K.**, Arabuli K. V., Evstrapov A. A., Timin A. S., Zyuzin M. V. Microfluidic synthesis of optically responsive materials for nano- and biophotonics // Advances in Colloid and Interface Science, 2021. Vol. 298. P. 102548.
6. **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 State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics, 2023. Vol. 16, №1.1. P. 389–392.
7. 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. Vol.16, №1.1. P.385–388.
8. Ваулин Н.В., **Афоничева П.К.**, Лебедев Д.В., Букатин А.С., Мухин И.С., Евstrapов А.А. Исследование фотоиндуцированных процессов в единичных твердотельных нанопорах с интегрированными плазмонными структурами // Физика твердого тела, 2023. Т.12. С. 2201
9. **Афоничева П.К.**, Ваулин Н.В., Лебедев Д.В., Букатин А.С., Мухин И.С., Евstrapов 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. 23. С. 35.

10. 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

11. **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

12. Ivanov Y.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.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю д.т.н. Евстрапову Анатолию Александровичу, а также коллективу лаборатории информационно-измерительных био- и хемосенсорных систем ИАП РАН, в особенности, д.ф.-м.н. Булянице Антону Леонидовичу, к.т.н. Белову Дмитрию Анатольевичу и к.т.н. Есиковой Надежде Александровне за ценные комментарии и рекомендации, которые помогли улучшить качество моей работы. Отдельная благодарность моим коллегам и друзьям из Алферовского университета Ваулину Никите Васильевичу и к.ф.-м.н. Лебедеву Денису Владимировичу за поддержку и сотрудничество, а также за обсуждения и всестороннюю помощь в работе. Я также выражаю признательность к.ф.-м.н. Букатину Антону Сергеевичу и заведующему лабораторией возобновляемых источников энергии СПбАУ д.ф.-м.н. Мухину Ивану Сергеевичу за предоставленные ресурсы и возможность проводить эксперименты, которые стали основой моего исследования. Не могу не отметить поддержку всей своей большой семьи и друзей, особенно к.ф.-м.н. Денисова Константина Сергеевича и к.ф.-м.н. Корякиной Ирины Георгиевны. Спасибо за то, что всегда были рядом.

Без вашей помощи и поддержки эта работа не была бы возможна.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей работе применяются следующие определения и сокращения:

АСМ – атомно-силовой микроскоп;

ВАХ – вольт-амперная характеристика;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДЭС – двойной электрический слой;

МФ – мастер-форма;

МФУ – микрофлюидное устройство;

МФЧ – микрофлюидный чип;

МЧ – магнитные частицы;

ПЭМ – просвечивающий электронный микроскоп;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

РЭМ – растровый электронный микроскоп;

НК – нуклеиновая кислота;

ПДМС – полидиметилсилоксан;

ППР – поверхностный плазмонный резонанс;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;

ПММА – полиметилметакрилат;

ЭО – электроосмос;

ЭОП – электроосмотический поток;

ЭФ – электрофорез;

ALD – атомно-слоевое осаждение;

CDB – контролируемого пробоя диэлектрика (Controlled dielectric breakdown);

COPs/CoCs – циклоолефиновые полимеры и сополимеры

FIB – сфокусированный ионный луч (focused ion beam);

TEs – тиоловые полимеры;

2D – двумерные.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Liu H. et al. Solid-State Nanopore Array: Manufacturing and Applications // Small. John Wiley and Sons Inc, 2023. Vol. 19, № 6.
2. Ouyang W., Han J. Universal amplification-free molecular diagnostics by billion-fold hierarchical nanofluidic concentration // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019. Vol. 116, № 33. P. 16240–16249.
3. Zhang X. et al. Solid-State Nanopore/Nanochannel Sensors with Enhanced Selectivity through Pore-in Modification // Analytical Chemistry. American Chemical Society, 2024. Vol. 96, № 6. P. 2277–2285.
4. Shi W., Friedman A.K., Baker L.A. Nanopore Sensing // Anal Chem. 2017. Vol. 89, № 1. P. 157–188.
5. Sen P., Gupta M. Single nucleotide detection using bilayer MoS₂nanopores with high efficiency // RSC Adv. Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 11, № 11. P. 6114–6123.
6. Yang H. et al. Identification of Single Nucleotides by a Tiny Charged Solid-State Nanopore // Journal of Physical Chemistry B. American Chemical Society, 2018. Vol. 122, № 32. P. 7929–7935.
7. Welch E.C. et al. Advances in Biosensors and Diagnostic Technologies Using Nanostructures and Nanomaterials // Advanced Functional Materials. John Wiley and Sons Inc, 2021. Vol. 31, № 44.
8. Branton D. et al. The potential and challenges of nanopore sequencing // Nature Biotechnology. 2008. Vol. 26, № 10. P. 1146–1153.
9. Hou X., Guo W., Jiang L. Biomimetic smart nanopores and nanochannels // Chem Soc Rev. 2011. Vol. 40, № 5. P. 2385.
10. Chou Y.C. et al. Lifetime and Stability of Silicon Nitride Nanopores and Nanopore Arrays for Ionic Measurements // ACS Nano. American Chemical Society, 2020. Vol. 14, № 6. P. 6715–6728.
11. Pud S. et al. Self-Aligned Plasmonic Nanopores by Optically Controlled Dielectric Breakdown // Nano Lett. 2015. Vol. 15, № 10. P. 7112–7117.

12. Liu S. et al. Boron Nitride Nanopores: Highly Sensitive DNA Single-Molecule Detectors // *Advanced Materials*. 2013. Vol. 25, № 33. P. 4549–4554.
13. Zhao Y. et al. Label-Free Optical Analysis of Biomolecules in Solid-State Nanopores: Toward Single-Molecule Protein Sequencing // *ACS Photonics*. 2022. Vol. 9, № 3. P. 730–742.
14. Dwyer J.R. et al. Silicon Nitride Thin Films for Nanofluidic Device Fabrication.
15. Wu M.-Y. et al. Formation of nanopores in a SiN/SiO₂ membrane with an electron beam // *Appl Phys Lett*. 2005. Vol. 87, № 11.
16. Graf M. et al. Fabrication and practical applications of molybdenum disulfide nanopores // *Nat Protoc*. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 14, № 4. P. 1130–1168.
17. Schneider G.F. et al. DNA Translocation through Graphene Nanopores // *Nano Lett*. 2010. Vol. 10, № 8. P. 3163–3167.
18. Verschueren D. V, Yang W., Dekker C. Lithography-based fabrication of nanopore arrays in freestanding SiN and graphene membranes // *Nanotechnology*. 2018. Vol. 29, № 14. P. 145302.
19. Dwyer J.R. et al. Silicon Nitride Thin Films for Nanofluidic Device Fabrication.
20. Lee K. et al. Surface modification of solid-state nanopore by plasma-polymerized chemical vapor deposition of poly(ethylene glycol) for stable device operation // *Nanotechnology*. 2020. Vol. 31, № 18. P. 185503.
21. Muhammad Sajeer P et al. TEM based applications in solid state nanopores: From fabrication to liquid in-situ bio-imaging // *Micron*. Elsevier Ltd, 2022. Vol. 162.
22. Wei J. et al. Nanopore-Based Sensors for DNA Sequencing: A Review // *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry (RSC), 2024.
23. Ying Y.L. et al. Nanopore-based technologies beyond DNA sequencing // *Nature Nanotechnology*. Nature Research, 2022. Vol. 17, № 11. P. 1136–1146.
24. Yang Y. et al. *Microfluidics for Biomedical Analysis* // *Small Methods*. John Wiley and Sons Inc., 2020. Vol. 4, № 4.
25. Lehnert T., Gijs M.A.M. Microfluidic systems for infectious disease diagnostics // *Lab Chip*. 2024. Vol. 24, № 5. P. 1441–1493.

26. Inamdar N.K., Borenstein J.T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering // *Curr Opin Biotechnol.* 2011. Vol. 22, № 5. P. 681–689.
27. Афоничева П.К., Буляница А.Л., Евстапов А.А. “Орган-на-чипе” — материалы и методы изготовления (обзор) // *Научное приборостроение*, 2019, том 29, № 4. 219AD. Т. 29, № 4. С. 3–18.
28. Sun A. et al. An integrated microfluidic platform for nucleic acid testing // *Microsyst Nanoeng.* 2024. Vol. 10, № 1. P. 66.
29. Gharib G. et al. Biomedical Applications of Microfluidic Devices: A Review // *Biosensors (Basel)*. 2022. Vol. 12, № 11. P. 1023.
30. Zhong Q. et al. *Advances of Microfluidics in Biomedical Engineering // Advanced Materials Technologies.* Wiley-Blackwell, 2019. Vol. 4, № 6.
31. Utech S. et al. Microfluidic Generation of Monodisperse, Structurally Homogeneous Alginate Microgels for Cell Encapsulation and 3D Cell Culture // *Adv Healthc Mater.* Wiley-VCH Verlag, 2015. Vol. 4, № 11. P. 1628–1633.
32. Wu J. et al. Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays // *Microchimica Acta.* 2014. Vol. 181, № 13–14. P. 1611–1631.
33. Archer M.J. et al. Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA // *Anal Biochem.* 2006. Vol. 355, № 2. P. 285–297.
34. Azimi S.M. et al. A magnetic bead-based DNA extraction and purification microfluidic device // *Microfluid Nanofluidics.* 2011. Vol. 11, № 2. P. 157–165.
35. Ali N. et al. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics // *Biomed Res Int.* 2017. Vol. 2017. P. 1–13.
36. Koryakina I.G. et al. Microfluidic synthesis of optically responsive materials for nano- and biophotonics // *Advances in Colloid and Interface Science.* Elsevier B.V., 2021. Vol. 298.
37. Sparreboom W., van den Berg A., Eijkel J.C.T. Principles and applications of nanofluidic transport // *Nat Nanotechnol.* 2009. Vol. 4, № 11. P. 713–720.
38. He Y. et al. Solid-state nanopore systems: from materials to applications // *NPG Asia Mater.* 2021. Vol. 13, № 1. P. 48.

39. Sticker D. et al. Thiol–Ene Based Polymers as Versatile Materials for Microfluidic Devices for Life Sciences Applications // *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020. Vol. 12, № 9. P. 10080–10095.
40. Pan L.-J. et al. Controllable synthesis of nanocrystals in droplet reactors // *Lab Chip*. 2018. Vol. 18, № 1. P. 41–56.
41. Hwang J. et al. Microchannel Fabrication on Glass Materials for Microfluidic Devices // *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*. 2019. Vol. 20, № 3. P. 479–495.
42. Singh A., Malek C.K., Kulkarni S.K. Development in microreactor technology for nanoparticle synthesis // *Int J Nanosci*. 2010. Vol. 09, № 01n02. P. 93–112.
43. Jacobson S.C. et al. Open Channel Electrochromatography on a Microchip // *Anal Chem*. 1994. Vol. 66, № 14. P. 2369–2373.
44. Harrison D.J. et al. Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip // *Science (1979)*. 1993. Vol. 261, № 5123. P. 895–897.
45. Song Y., Hormes J., Kumar C.S.S.R. Microfluidic Synthesis of Nanomaterials // *Small*. 2008. Vol. 4, № 6. P. 698–711.
46. Nielsen J.B. et al. Microfluidics: Innovations in Materials and Their Fabrication and Functionalization // *Anal Chem*. 2020. Vol. 92, № 1. P. 150–168.
47. Shakeri A. et al. Biofunctionalization of Glass- and Paper-Based Microfluidic Devices: A Review // *Adv Mater Interfaces*. 2019. Vol. 6, № 19. P. 1900940.
48. Martins J.P., Torrieri G., Santos H.A. The importance of microfluidics for the preparation of nanoparticles as advanced drug delivery systems // *Expert Opin Drug Deliv*. 2018. Vol. 15, № 5. P. 469–479.
49. Ren K., Zhou J., Wu H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication // *Acc Chem Res*. 2013. Vol. 46, № 11. P. 2396–2406.
50. Campbell S.B. et al. Beyond Polydimethylsiloxane: Alternative Materials for Fabrication of Organ-on-a-Chip Devices and Microphysiological Systems // *ACS Biomater Sci Eng*. 2021. Vol. 7, № 7. P. 2880–2899.

51. Niculescu A.G. et al. Fabrication and applications of microfluidic devices: A review // *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 2021. Vol. 22, № 4. P. 1–26.
52. Ofner A. et al. High-Throughput Step Emulsification for the Production of Functional Materials Using a Glass Microfluidic Device // *Macromol Chem Phys*. 2017. Vol. 218, № 2. P. 1600472.
53. Boodaghi M., Shamloo A. A comparison of different geometrical elements to model fluid wicking in paper-based microfluidic devices // *AIChE Journal*. 2020. Vol. 66, № 1.
54. Rivet C. et al. Microfluidics for medical diagnostics and biosensors // *Chem Eng Sci*. 2011. Vol. 66, № 7. P. 1490–1507.
55. Liao S. et al. Solvent-resistant and fully recyclable perfluoropolyether-based elastomer for microfluidic chip fabrication // *J Mater Chem A Mater*. 2019. Vol. 7, № 27. P. 16249–16256.
56. Gale B. et al. A Review of Current Methods in Microfluidic Device Fabrication and Future Commercialization Prospects // *Inventions*. 2018. Vol. 3, № 3. P. 60.
57. Waldbaur A. et al. Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes // *Analytical Methods*. 2011. Vol. 3, № 12. P. 2681.
58. Fiorini G.S., Chiu D.T. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application // *Biotechniques*. 2005. Vol. 38, № 3. P. 429–446.
59. Iliescu C. et al. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon // *Biomicrofluidics*. 2012. Vol. 6, № 1. P. 016505.
60. Wlodarczyk K. et al. Rapid Laser Manufacturing of Microfluidic Devices from Glass Substrates // *Micromachines (Basel)*. 2018. Vol. 9, № 8. P. 409.
61. Baker C.A., Bulloch R., Roper M.G. Comparison of separation performance of laser-ablated and wet-etched microfluidic devices // *Anal Bioanal Chem*. 2011. Vol. 399, № 4. P. 1473–1479.
62. Carrell C. et al. Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics // *Microelectron Eng*. 2019. Vol. 206. P. 45–54.

63. Guckenberger D.J. et al. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices // *Lab Chip*. 2015. Vol. 15, № 11. P. 2364–2378.
64. Faustino V. et al. Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review // *J Biomech*. 2016. Vol. 49, № 11. P. 2280–2292.
65. Becker H. Polymer microfluidic devices // *Talanta*. 2002. Vol. 56, № 2. P. 267–287.
66. Xia Y., Whitesides G.M. *Soft Lithography* // *Angewandte Chemie International Edition*. 1998. Vol. 37, № 5. P. 550–575.
67. Su W. et al. Fully inkjet-printed microfluidics: a solution to low-cost rapid three-dimensional microfluidics fabrication with numerous electrical and sensing applications // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6, № 1. P. 35111.
68. Evstrapov A.A. et al. Ion and electron beam assisted fabrication of nanostructures integrated in microfluidic chips // *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 2012. Vol. 282. P. 145–148.
69. Xia D., Yan J., Hou S. Fabrication of Nanofluidic Biochips with Nanochannels for Applications in DNA Analysis // *Small*. 2012. Vol. 8, № 18. P. 2787–2801.
70. Chen X., Zhang L. Review in manufacturing methods of nanochannels of bio-nanofluidic chips // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Elsevier B.V., 2018. Vol. 254. P. 648–659.
71. Mokkalapati V.R.S.S. et al. DNA tracking within a nanochannel: device fabrication and experiments // *Lab Chip*. 2011. Vol. 11, № 16. P. 2711.
72. O'Brien M.J. et al. Fabrication of an integrated nanofluidic chip using interferometric lithography // *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*. 2003. Vol. 21, № 6. P. 2941.
73. Wu W. et al. Nanoimprint lithography with ≤ 60 nm overlay precision // *Applied Physics A*. 2012. Vol. 106, № 4. P. 767–772.
74. Nam S.-W. et al. Sub-10-nm Nanochannels by Self-Sealing and Self-Limiting Atomic Layer Deposition // *Nano Lett*. 2010. Vol. 10, № 9. P. 3324–3329.
75. Chen Y. Nanofabrication by electron beam lithography and its applications: A review // *Microelectron Eng*. 2015. Vol. 135. P. 57–72.

76. Menard L.D., Ramsey J.M. Fabrication of Sub-5 nm Nanochannels in Insulating Substrates Using Focused Ion Beam Milling // *Nano Lett.* 2011. Vol. 11, № 2. P. 512–517.
77. Fried J.P. et al. In situ solid-state nanopore fabrication // *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 50, № 8. P. 4974–4992.
78. Fürjes P. Controlled focused ion beam milling of composite solid state nanopore arrays for molecule sensing // *Micromachines (Basel)*. MDPI AG, 2019. Vol. 10, № 11.
79. Li J. et al. Ion-beam sculpting at nanometre length scales // *Nature*. 2001. Vol. 412, № 6843. P. 166–169.
80. Waugh M. et al. Solid-state nanopore fabrication by automated controlled breakdown // *Nat Protoc. Nature Research*, 2020. Vol. 15, № 1. P. 122–143.
81. Kwok H., Briggs K., Tabard-Cossa V. Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 3. P. e92880.
82. Briggs K., Kwok H., Tabard-Cossa V. Automated Fabrication of 2-nm Solid-State Nanopores for Nucleic Acid Analysis // *Small*. 2014. Vol. 10, № 10. P. 2077–2086.
83. Goto Y. et al. Integrated solid-state nanopore platform for nanopore fabrication via dielectric breakdown, DNA-speed deceleration and noise reduction // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6, № 1. P. 31324.
84. Tahvildari R. et al. Integrating nanopore sensors within microfluidic channel arrays using controlled breakdown // *Lab Chip*. 2015. Vol. 15, № 6. P. 1407–1411.
85. Yanagi I. et al. Multichannel detection of ionic currents through two nanopores fabricated on integrated Si₃N₄ membranes // *Lab Chip*. 2016. Vol. 16, № 17. P. 3340–3350.
86. Goto Y. et al. Solid-state nanopores towards single-molecule DNA sequencing // *J Hum Genet*. 2020. Vol. 65, № 1. P. 69–77.
87. Xue L. et al. Solid-state nanopore sensors // *Nature Reviews Materials*. Nature Research, 2020. Vol. 5, № 12. P. 931–951.

88. Asandei A. et al. Nanopore-Based Protein Sequencing Using Biopores: Current Achievements and Open Challenges // *Small Methods*. 2020. Vol. 4, № 11. P. 1900595.
89. Lee K. et al. Recent Progress in Solid-State Nanopores // *Advanced Materials*. 2018. Vol. 30, № 42. P. 1704680.
90. He Y. et al. Solid-state nanopore systems: from materials to applications // *NPG Asia Materials*. Nature Research, 2021. Vol. 13, № 1.
91. DEKKER C. Solid-state nanopores // *Nanoscience and Technology*. Co-Published with Macmillan Publishers Ltd, UK, 2009. P. 60–66.
92. URL: <https://nanoporetech.com/> (Дата обращения: 09.01.2025) [Electronic resource].
93. Wanunu M. et al. Rapid electronic detection of probe-specific microRNAs using thin nanopore sensors // *Nat Nanotechnol*. 2010. Vol. 5, № 11. P. 807–814.
94. Venkatesan B.M., Bashir R. Nanopore sensors for nucleic acid analysis // *Nat Nanotechnol*. 2011. Vol. 6, № 10. P. 615–624.
95. Carson S., Wanunu M. Challenges in DNA motion control and sequence readout using nanopore devices // *Nanotechnology*. 2015. Vol. 26, № 7. P. 074004.
96. Pungetmongkol P. Speculation of Nano-gap Sensor for DNA sequencing technology: A Review on Synthetic Nanopores // *Engineering Journal*. 2018. Vol. 22, № 6. P. 229–250.
97. Laszlo A.H. et al. Decoding long nanopore sequencing reads of natural DNA // *Nat Biotechnol*. 2014. Vol. 32, № 8. P. 829–833.
98. Fologea D. et al. Slowing DNA Translocation in a Solid-State Nanopore // *Nano Lett*. 2005. Vol. 5, № 9. P. 1734–1737.
99. Kowalczyk S.W. et al. Slowing down DNA Translocation through a Nanopore in Lithium Chloride // *Nano Lett*. 2012. Vol. 12, № 2. P. 1038–1044.
100. Verschueren D. V, Jonsson M.P., Dekker C. Temperature dependence of DNA translocations through solid-state nanopores // *Nanotechnology*. 2015. Vol. 26, № 23. P. 234004.

101. Wanunu M. et al. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient // *Nat Nanotechnol.* Nature Publishing Group, 2010. Vol. 5, № 2. P. 160–165.
102. Squires A.H. et al. A Nanopore–Nanofiber Mesh Biosensor To Control DNA Translocation // *J Am Chem Soc.* 2013. Vol. 135, № 44. P. 16304–16307.
103. Goto Y. et al. Deceleration of single-stranded DNA passing through a nanopore using a nanometre-sized bead structure // *Sci Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 16640.
104. Tang Z. et al. Gel mesh as “brake” to slow down DNA translocation through solid-state nanopores // *Nanoscale.* 2015. Vol. 7, № 31. P. 13207–13214.
105. Yoshida H. et al. Slowing the translocation of single-stranded DNA by using nano-cylindrical passage self-assembled by amphiphilic block copolymers // *Nanoscale.* 2016. Vol. 8, № 43. P. 18270–18276.
106. Xia F. et al. Gating of Single Synthetic Nanopores by Proton-Driven DNA Molecular Motors // *J Am Chem Soc.* 2008. Vol. 130, № 26. P. 8345–8350.
107. Xiao K. et al. A Biomimetic Multi-Stimuli-Response Ionic Gate Using a Hydroxypyrene Derivation-Functionalized Asymmetric Single Nanochannel // *Advanced Materials.* 2014. Vol. 26, № 38. P. 6560–6565.
108. Tian Y., Hou X., Jiang L. Biomimetic ionic rectifier systems: Asymmetric modification of single nanochannels by ion sputtering technology // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2011. Vol. 656, № 1–2. P. 231–236.
109. Liu M. et al. A Bio-inspired Potassium and pH Responsive Double-gated Nanochannel // *Adv Funct Mater.* 2015. Vol. 25, № 3. P. 421–426.
110. Pevarnik M. et al. A hydrophobic entrance enhances ion current rectification and induces dewetting in asymmetric nanopores // *Analyst.* 2012. Vol. 137, № 13. P. 2944.
111. Zhang H. et al. Synthetic Asymmetric-Shaped Nanodevices with Symmetric pH-Gating Characteristics // *Adv Funct Mater.* 2015. Vol. 25, № 7. P. 1102–1110.
112. Nasir S. et al. Fabrication of Single Cylindrical Au-Coated Nanopores with Non-Homogeneous Fixed Charge Distribution Exhibiting High Current Rectifications // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014. Vol. 6, № 15. P. 12486–12494.

113. Zhang H., Tian Y., Jiang L. Fundamental studies and practical applications of bio-inspired smart solid-state nanopores and nanochannels // *Nano Today*. Elsevier B.V., 2016. Vol. 11, № 1. P. 61–81.
114. Jirage K.B., Hulteen J.C., Martin C.R. Nanotubule-Based Molecular-Filtration Membranes // *Science* (1979). 1997. Vol. 278, № 5338. P. 655–658.
115. Vlassioux I. et al. Versatile ultrathin nanoporous silicon nitride membranes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, № 50. P. 21039–21044.
116. Lee S.B. et al. Antibody-Based Bio-Nanotube Membranes for Enantiomeric Drug Separations // *Science* (1979). 2002. Vol. 296, № 5576. P. 2198–2200.
117. Zhu Z. et al. Ion/Molecule Transportation in Nanopores and Nanochannels: From Critical Principles to Diverse Functions // *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 2019. Vol. 141, № 22. P. 8658–8669.
118. Xiao K., Jiang L., Antonietti M. Ion Transport in Nanofluidic Devices for Energy Harvesting // *Joule*. Cell Press, 2019. Vol. 3, № 10. P. 2364–2380.
119. Kono N., Arakawa K. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics // *Development Growth and Differentiation*. Blackwell Publishing, 2019. Vol. 61, № 5. P. 316–326.
120. Kowalczyk S.W. et al. Modeling the conductance and DNA blockade of solid-state nanopores // *Nanotechnology*. 2011. Vol. 22, № 31.
121. Lebedev D. et al. Focused ion beam milling based formation of nanochannels in silicon-glass microfluidic chips for the study of ion transport // *Microfluid Nanofluidics*. 2021. Vol. 25, № 6. P. 51.
122. Masliyah J.H., Bhattacharjee S. *Electrokinetic and colloid transport phenomena*. John Wiley & Sons, 2006.
123. Ünlü M., Morgan M.E., Minden J.S. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts // *Electrophoresis*. 1997. Vol. 18, № 11. P. 2071–2077.

124. Peng R. *Electrokinetic Transport Phenomena in Nanochannels and Applications of Nanochannel-based Devices in Nanoparticle Detection and Molecule Sensing*. 2018.
125. Chinappi M. et al. Analytical model for particle capture in nanopores elucidates competition among electrophoresis, electroosmosis, and dielectrophoresis // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2020. Vol. 14, № 11. P. 15816–15828.
126. Grosberg A.Y., Rabin Y. DNA capture into a nanopore: Interplay of diffusion and electrohydrodynamics // *Journal of Chemical Physics*. 2010. Vol. 133, № 16.
127. Saharia J. et al. Modulation of electrophoresis, electroosmosis and diffusion for electrical transport of proteins through a solid-state nanopore // *RSC Adv*. Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 11, № 39. P. 24398–24409.
128. Bandara Y.M.N.D.Y., Karawdeniya B.I., Dwyer J.R. Push-Button Method to Create Nanopores Using a Tesla-Coil Lighter // *ACS Omega*. American Chemical Society, 2019. Vol. 4, № 1. P. 226–230.
129. Melnikov D. V., Hulings Z.K., Gracheva M.E. Electro-osmotic flow through nanopores in thin and ultrathin membranes // *Phys Rev E*. 2017. Vol. 95, № 6. P. 063105.
130. Bandara Y.M.N.D.Y. et al. Chemically Functionalizing Controlled Dielectric Breakdown Silicon Nitride Nanopores by Direct Photohydrosilylation // *ACS Appl Mater Interfaces*. American Chemical Society, 2019. Vol. 11, № 33. P. 30411–30420.
131. D. Y. Bandara Y.M.N. et al. Beyond nanopore sizing: Improving solid-state single-molecule sensing performance, lifetime, and analyte scope for omics by targeting surface chemistry during fabrication // *Nanotechnology*. Institute of Physics Publishing, 2020. Vol. 31, № 33.
132. Auger T. et al. Zero-mode waveguide detection of flow-driven DNA translocation through nanopores // *Phys Rev Lett*. American Physical Society, 2014. Vol. 113, № 2.

133. Zhang Y. et al. Electroosmotic Facilitated Protein Capture and Transport through Solid-State Nanopores with Diameter Larger than Length // *Small Methods*. John Wiley and Sons Inc, 2020. Vol. 4, № 11.
134. Firnkjes M. et al. Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: Conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis // *Nano Lett.* 2010. Vol. 10, № 6. P. 2162–2167.
135. Paik K.H. et al. Control of DNA capture by nanofluidic transistors // *ACS Nano*. 2012. Vol. 6, № 8. P. 6767–6775.
136. Luo L., Holden D.A., White H.S. Negative differential electrolyte resistance in a solid-state nanopore resulting from electroosmotic flow bistability // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2014. Vol. 8, № 3. P. 3023–3030.
137. Emilsson G. et al. Gating Protein Transport in Solid State Nanopores by Single Molecule Recognition // *ACS Cent Sci*. American Chemical Society, 2018. Vol. 4, № 8. P. 1007–1014.
138. James M. et al. Microfluidic Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, № 11. P. 2113.
139. Garoli D. et al. Plasmonic Nanopores for Single-Molecule Detection and Manipulation: Toward Sequencing Applications // *Nano Letters*. American Chemical Society, 2019. Vol. 19, № 11. P. 7553–7562.
140. Zhang M. et al. Thermophoresis-Controlled Size-Dependent DNA Translocation through an Array of Nanopores // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2018. Vol. 12, № 5. P. 4574–4582.
141. Munaz A., Shiddiky M.J.A., Nguyen N.-T. Recent advances and current challenges in magnetophoresis based micro magnetofluidics // *Biomicrofluidics*. 2018. Vol. 12, № 3. P. 031501.
142. Ardui S. et al. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, № 5. P. 2159–2168.
143. Verschueren D., Shi X., Dekker C. Nano-Optical Tweezing of Single Proteins in Plasmonic Nanopores // *Small Methods*. 2019. Vol. 3, № 5.

144. Pereiro I. et al. Nip the bubble in the bud: A guide to avoid gas nucleation in microfluidics // *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 19, № 14. P. 2296–2314.
145. Fragasso A., Schmid S., Dekker C. Comparing Current Noise in Biological and Solid-State Nanopores // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2020. Vol. 14, № 2. P. 1338–1349.
146. Tabard-Cossa V. Instrumentation for Low-Noise High-Bandwidth Nanopore Recording // *Engineered Nanopores for Bioanalytical Applications*. Elsevier, 2013. P. 59–93.
147. Smeets R.M.M. et al. Nanobubbles in solid-state nanopores // *Phys Rev Lett*. 2006. Vol. 97, № 8.
148. Tabard-Cossa V. et al. Noise analysis and reduction in solid-state nanopores // *Nanotechnology*. 2007. Vol. 18, № 30.
149. Smeets R.M.M., Dekker N.H., Dekker C. Low-frequency noise in solid-state nanopores // *Nanotechnology*. 2009. Vol. 20, № 9.
150. Wang C.M. et al. Surface engineering of synthetic nanopores by atomic layer deposition and their applications // *Frontiers of Materials Science*. 2013. Vol. 7, № 4. P. 335–349.
151. Beamish E. et al. Precise control of the size and noise of solid-state nanopores using high electric fields // *Nanotechnology*. 2012. Vol. 23, № 40.
152. URL: https://scicrunch.org/resolver/SCR_002184 (Дата обращения: 11.01.2025).
153. URL: <https://www.easyelectrophysiology.com/> (Дата обращения: 11.01.2025).
154. URL: <https://www.moleculardevices.com/products/axon-patch-clamp-system/acquisition-and-analysis-software/pclamp-software-suite> (Дата обращения: 11.01.2025).
155. URL: <https://www.epfl.ch/labs/lben/opennanopore-python/> (Дата обращения: 11.01.2025).
156. Forstater J.H. et al. MOSAIC: A Modular Single-Molecule Analysis Interface for Decoding Multistate Nanopore Data // *Anal Chem*. 2016. Vol. 88, № 23. P. 11900–11907.

157. Tu J. et al. EasyNanopore: A Ready-to-Use Processing Software for Translocation Events in Nanopore Translocation Experiments // *Langmuir*. American Chemical Society, 2021. Vol. 37, № 33. P. 10177–10182.
158. Xia K. et al. Synthetic heparan sulfate standards and machine learning facilitate the development of solid-state nanopore analysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021. Vol. 118, № 11.
159. Sun Z. et al. AutoNanopore: An Automated Adaptive and Robust Method to Locate Translocation Events in Solid-State Nanopore Current Traces // *ACS Omega*. American Chemical Society, 2022. Vol. 7, № 42. P. 37103–37111.
160. Edwards M.A. et al. High-Speed Multipass Coulter Counter with Ultrahigh Resolution // *ACS Nano*. 2015. Vol. 9, № 12. P. 12274–12282.
161. Howorka S., Cheley S., Bayley H. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores // *Nat Biotechnol*. 2001. Vol. 19, № 7. P. 636–639.
162. Pennisi E. Search for Pore-fection // *Science* (1979). 2012. Vol. 336, № 6081. P. 534–537.
163. Huang S. et al. High-throughput optical sensing of nucleic acids in a nanopore array // *Nat Nanotechnol*. 2015. Vol. 10, № 11. P. 986–991.
164. Deng T. et al. Development of solid-state nanopore fabrication technologies // *Sci Bull (Beijing)*. 2015. Vol. 60, № 3. P. 304–319.
165. Wanunu M. Nanopores: A journey towards DNA sequencing // *Phys Life Rev*. 2012. Vol. 9, № 2. P. 125–158.
166. Xie P. et al. Local electrical potential detection of DNA by nanowire-nanopore sensors // *Nat Nanotechnol*. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 7, № 2. P. 119–125.
167. Chen Q., Liu Z. Fabrication and Applications of Solid-State Nanopores // *Sensors*. 2019. Vol. 19, № 8. P. 1886.
168. URL: <https://www.pacb.com/> (Дата обращения: 09.01.2025). 2021.
169. URL: <https://www.bio-rad.com/> (Дата обращения: 10.01.2025).
170. URL: <https://nanoporetech.com/products> (Дата обращения: 10.01.2025).

171. Xiao T., Zhou W. The third generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases // *Transl Pediatr.* 2020. Vol. 9, № 2. P. 163–173.
172. Gao N., Xie C. Experimental demonstration of free-space optical vortex transmutation with polygonal lenses. 2012.
173. Howorka S., Siwy Z. Nanopores and Nanochannels: From Gene Sequencing to Genome Mapping // *ACS Nano.* 2016. Vol. 10, № 11. P. 9768–9771.
174. SUN X. et al. Nanostructures Integrated with a Nanochannel for Slowing Down DNA Translocation Velocity for Nanopore Sequencing // *Analytical Sciences.* 2017. Vol. 33, № 6. P. 735–738.
175. Chan E.Y. et al. DNA Mapping Using Microfluidic Stretching and Single-Molecule Detection of Fluorescent Site-Specific Tags // *Genome Res.* 2004. Vol. 14, № 6. P. 1137–1146.
176. Fang Lim S. et al. DNA methylation profiling in nanochannels // *Biomicrofluidics.* 2011. Vol. 5, № 3. P. 034106.
177. Reisner W. et al. Single-molecule denaturation mapping of DNA in nanofluidic channels // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010. Vol. 107, № 30. P. 13294–13299.
178. Yazda K. et al. Voltage-activated transport of ions through single-walled carbon nanotubes // *Nanoscale.* Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 9, № 33. P. 11976–11986.
179. Esfandiar A. et al. Size effect in ion transport through angstrom-scale slits // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 2017. Vol. 358, № 6362. P. 511–513.
180. Hu R., Tong X., Zhao Q. Four Aspects about Solid-State Nanopores for Protein Sensing: Fabrication, Sensitivity, Selectivity, and Durability // *Adv Healthc Mater.* 2020. Vol. 9, № 17. P. 2000933.