

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Санкт-Петербург 2025

**Работа выполнена** в лаборатории информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем в Институте аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН).

**Научный руководитель:**

Доктор технических наук, директор  
Института аналитического  
приборостроения Российской академии  
наук

Евстрапов Анатолий  
Александрович

**Официальные оппоненты:**

Доктор химических наук, профессор,  
директор Института биохимической физики  
имени Н. М. Эмануэля Российской академии  
наук

Курочкин Илья Николаевич

Доктор технических наук, доцент кафедры  
Микро- и Нанoeлектроники, СПбГЭТУ  
«ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)

Спивак Юлия Михайловна

**Ведущая организация:**

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической  
медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального  
Медикобиологического Агентства», Центр технологий и микрофабрикации

Защита состоится 16 мая 2025 года в 14:00 на заседании диссертационного совета  
24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения (ИАП РАН) по  
адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП  
РАН по тому же адресу и на сайте <https://www.iairas.ru/> в сети Интернет. Отзывы  
на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 198095, а/я 140, Санкт-  
Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, доктор физико-математических  
наук

А.Л.Буляница

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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  $\text{SiN}_x$  [14],  $\text{SiO}_2$  [15], а также двумерные (2D) материалы, например, графен,  $\text{MoS}_2$  [16],  $\text{MXene}$  [17,18]. В исследованиях для изготовления нанопорых 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  $\text{SiN}_x$  является травление сфокусированным электронным или ионным лучом [21]. Этот метод позволяет точно контролировать размер пор ( $<1$  нм) и конфигурацию.

В большинстве случаев нанопорный 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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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 контролируемые 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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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 контролируемые 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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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  $\sim 50$  нм, глубина  $\sim 10$  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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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 А.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.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обосновывается актуальность темы диссертации, формулируются цель и задачи исследования, излагаются практическая значимость и научная новизна работы, а также положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** представлен обзор и анализ современных литературных источников, который подчеркивает актуальность исследований в области микро- и нанофлюидики, направленных на разработку новых устройств с интегрированными наноструктурами.

**В разделе 1.1** показаны различные применения микрофлюидных чипов с наноструктурами для биомедицинских исследований, а именно использование в системах «орган-на-чипе», при синтезе наночастиц, а также при пробоподготовке и анализе нуклеиновых кислот. Представлено краткое описание используемых в чипах функциональных микро- и наноструктур, таких как магнитные частицы, нанопоры, наноканалы.

**В разделе 1.2** рассмотрено современное состояние исследований и методов изготовления микроканалов, а также твердотельных наноструктур (нанопор и наноканалов), освещаются их ключевые характеристики. Так, одним из наиболее распространенных методов формирования твердотельных нанопор и наноканалов в кремнии является травление с помощью сфокусированного электронного или ионного луча.

**В разделе 1.3** рассмотрены наноструктуры для обнаружения и идентификации отдельных молекул, а именно биологические и твердотельные нанопоры, а также различные характеристики нанопор и наноканалов, их транспортные свойства и селективность.

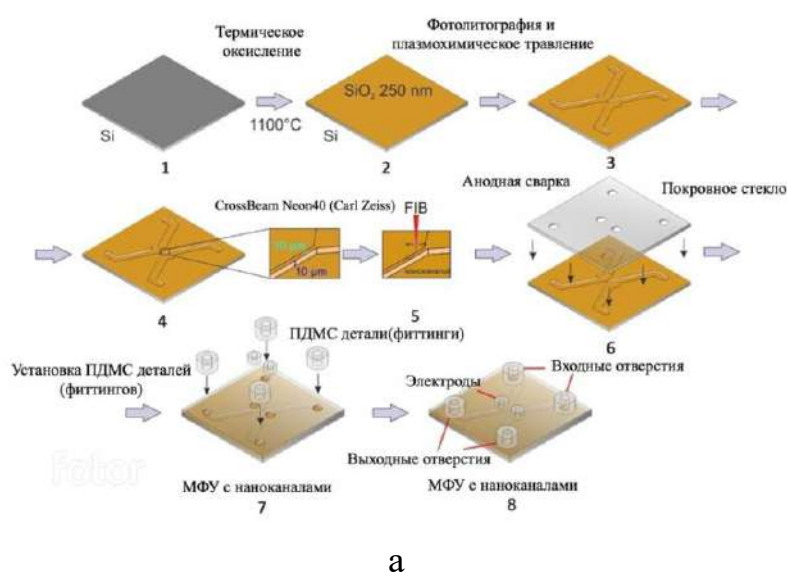
**В разделе 1.4** представлены разные методы управления транспортом биологических молекул в микро-и нанофлюидных устройствах.

**В разделе 1.5** внимание уделено особенностям экспериментальных исследований, связанных с твердотельными нанопорами и наноканалами, а именно возникновению пузырей газа в области мембраны во время измерений, низкому соотношению сигнал/шум, а также сложности методов обработки полученных сигналов для определения достоверных событий транслокации. В данном разделе рассматриваются причины возникновения, а также способы преодоления перечисленных трудностей.

**В разделе 1.6** рассмотрены области применения наноструктур для биологических и медицинских применений.

**Во второй главе** представлены разработка и изготовление кремний-стеклянного микрофлюидного устройства (МФУ) с наноканалами, а также исследование ионной проводимости наноканалов.

**Раздел 2.1** посвящен разработке и апробации способа изготовления кремний-стеклянного МФУ с наноканалами методами оптической литографии и травлением сфокусированным ионным лучом. Разработана оригинальная топология X-образной формы, представляющая собой два микроканала и разделяющую их тонкую мембрану. Для получения наноканалов и управления процессом травления используются системы перекрестных электронных и ионных пучков CrossBeam Neon40 (Carl Zeiss). Оригинальным решением в технологии изготовления МФУ стал способ герметизации методом анодного сваривания. С помощью анодного сваривания создается прочное соединение между оксидированной поверхностью кремния и покровным стеклом. Этапы изготовления МФУ с наноканалами, а также фотография полученного устройства приведены на рисунке 1.



а

б

Рисунок 1 – а. Этапы изготовления МФУ с наноканалами. б. Фотография МФУ, оснащенного ПДМС фитингами

Полученные наноразмерные структуры охарактеризованы методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) и растровой электронной микроскопии (РЭМ) (рисунок 2). Толщина мембраны, разделяющей два микроканала, составляет 10 мкм. Исследовалась зависимость геометрических размеров наноканала от времени травления в интервале от 2 до 60 с. Травление проводилось при токе ионного пучка 10 пА. На рисунке 3 показана зависимость ширины и глубины наноканалов от времени травления, полученная с помощью АСМ с острым кремниевым зондом (НА-FM, NT-MDT SI Ltd). Ширина каналов после 10 с травления линейно растет с увеличением времени травления, в то время как глубина наноканалов изменяется сразу после начала травления, выходя на насыщение после 20 с. Такой эффект связан с явлением повторного осаждения ионов галлия во время травления. При выбранном минимальном времени травления 10 секунд глубина наноканалов составляет ~10 нм, ширина ~50-60 нм.

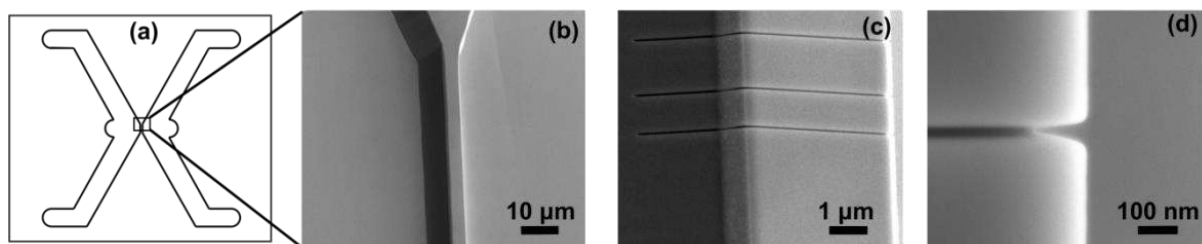


Рисунок 2 – а: Топология микрофлюидного чипа, b-d: изображения наноканалов в кремниевой мембране полученные с помощью РЭМ

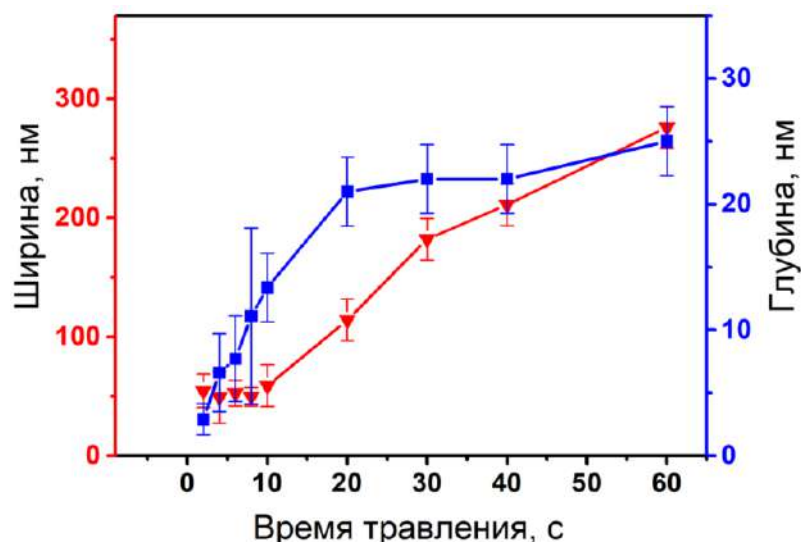


Рисунок 3 – Зависимость ширины и глубины наноканалов от времени травления

Предложенный способ изготовления позволяет создавать герметичные МФУ с двумя микроканальными системами, разделенными мембраной с наноканалами. Проверка герметичности показала, что устройство можно использовать при давлении до 202,65 кПа без его повреждения. Полученное МФУ можно повторно использовать после процедуры восстановления. Изготовлено 3 устройства, в каждом устройстве были сформированы 15 наноканалов, погрешность в их размерах составила не более 20%.

**В разделе 2.2.** представлено исследование транспортных свойства наноканалов методом измерения ионной проводимости. Схема эксперимента показана на рисунке 4. С помощью двухканального шприцевого насоса Harvard Apparatus PHD 2000 (США) и системы подводящих капилляров во входные отверстия МФУ подавался водный раствор электролита заданной концентрации. Подвод хлорсеребряных электродов и их герметичность обеспечивалась ПДМС деталями, расположенными по разные стороны от мембраны с наноканалами, так, чтобы электроды были погружены в раствор. В процессе измерения были получены линейные вольт-амперные характеристики (ВАХ). Измерения ВАХ с повторами проводились при концентрациях рабочего раствора электролита KCl от 0,1 mM до 0,1 M. На рисунке 5a приведены ВАХ, измеренные на одном и том

же устройстве при одинаковых условиях до и после 3 месяцев хранения, результаты изменились лишь на 10%.

Значения проводимости для наноканалов при разных концентрациях рабочего раствора KCl в диапазоне от 0,1 мМ до 0,1 М представлены на рисунке 5б. С помощью одномерной модели аппроксимированы экспериментальные результаты, определен эффективный диаметр наноканалов 20 нм и плотность поверхностного заряда внутри канала, которая составила 1,5 мКл/м<sup>2</sup>. Подтверждено наличие зарядовой селективности в наноканалах.

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

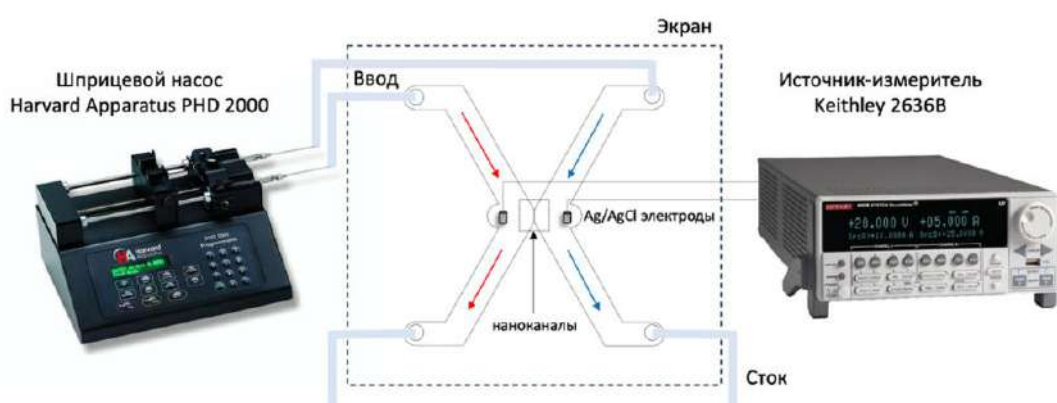


Рисунок 4 – Схема измерения: шприцевым насосом Harvard Apparatus PHD через подводящие капилляры подается рабочий раствор во входные отверстия МФУ, AgCl/Ag электроды расположены с двух сторон от мембраны с наноканалами и подключены к измерителю Keithley 2636B

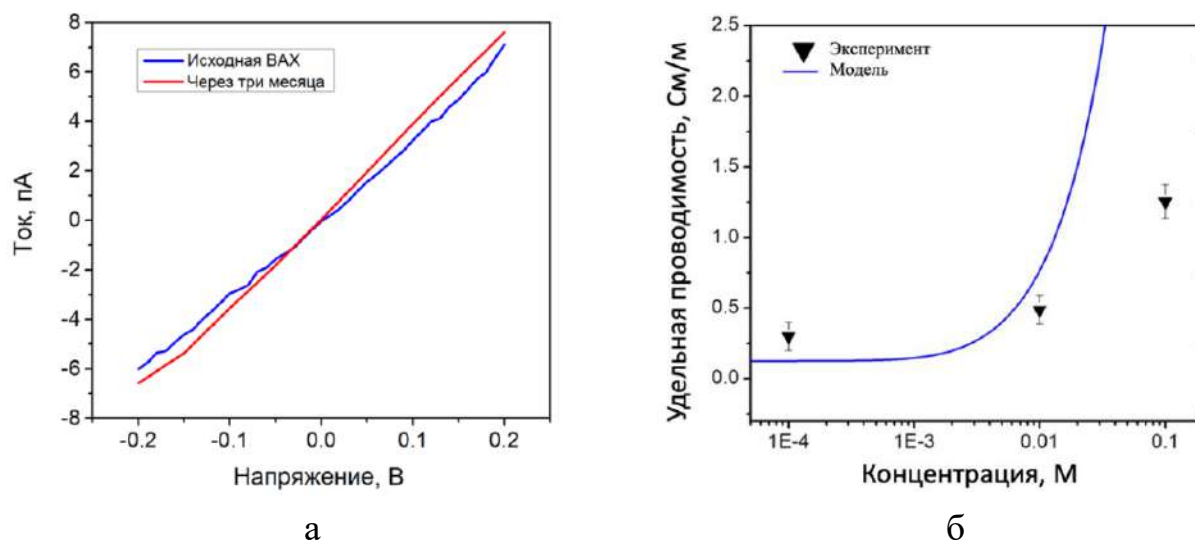


Рисунок 5 – а. Исходная вольтамперная характеристика и через 3 месяца б. Экспериментальная и теоретическая зависимости ионной проводимости наноканалов от концентрации рабочего раствора. Погрешность измерений составила 10-15%.

В третьей главе представлены исследования твердотельных нанопор в свободноподвешенной  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  мембране, описано изготовление электрохимической измерительной ячейки, а также протокол ее подготовки и методика эксперимента по изучению механизмов селективного ионного транспорта.

Раздел 3.1. посвящен описанию процесса изготовления нанопор в свободноподвешенной мембране из нитрида кремния. Стадии формирования представлены на рисунке 7а. Для формирования мембраны кремниевая пластина термически окисляется, затем методом химического осаждения из газовой фазы при низком давлении (LP-CVD) на полученный слой  $\text{SiO}_2$  наносится слой  $\text{SiN}_x$  толщиной 40 нм. Толщина этого слоя определяет длину будущих пор. После формирования мембраны с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) посередине мембраны изготавливается нанопора. ПЭМ обеспечивает контролируемое изготовление нанопор диаметром 5 нм, выход годных изделий не менее 60%. ПЭМ-изображения нанопор и распределение диаметров формируемых нанопор по размерам представлены на рисунке 7б. Получены образцы, представляющие собой свободно подвешенную  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  мембрану толщиной 40 нм с одиночной нанопорой диаметром  $\sim 5$  нм.

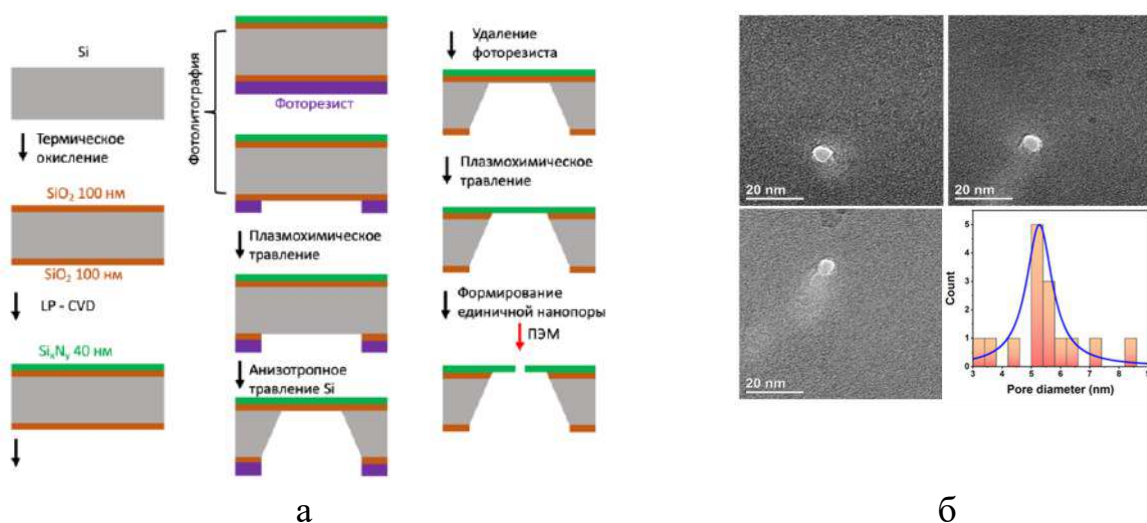


Рисунок 7 – Стадии формирования твердотельных нанопор в  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  мембране.

б. ПЭМ-изображения трех  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  нанопор длиной 40 нм и диаметром  $\sim 5$  нм и распределение диаметров формируемых нанопор по размерам

Раздел 3.2 посвящен разработке электрохимической ячейки для экспериментов по изучению ионного транспорта через  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  мембрану с одиночной нанопорой. 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 фиксируется мембрана с 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. Внедрены технические решения, обеспечивающие герметичность системы, препятствующие загрязнению и образованию пузырей газа в процессе заполнения и эксперимента. Подвод жидкости к *cis*- и *trans*- объемам осуществлен с помощью капилляров, для фиксации мембраны с нанопорой между объемами и для подвода электродов к раствору используются уплотнители из полидиметилсилоксана (ПДМС). Ячейка оснащена стеклянным окном для оптического доступа к мембране с помощью оптического микроскопа. Изготовленная ячейка позволяет использовать объектив 50x с рабочим расстоянием 5 мм. Другой вариант ячейки с *cis*- и *trans*-объемами по 650 мкл представлен рисунке 8 и имеет вертикальное исполнение, позволяющее проводить исследования биологических проб (растворы нуклеиновых кислот, белков).

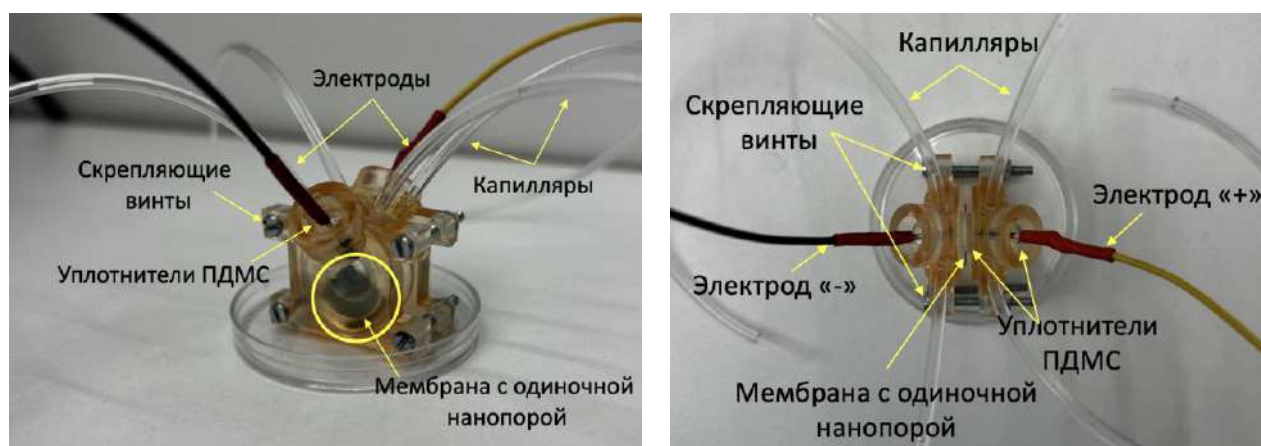


Рисунок 8 – Электрохимическая ячейка для биологических экспериментов

**Раздел 3.3** посвящен разработке и апробации протокола подготовки электрохимической ячейки и методике проведения эксперимента по изучению селективного ионного транспорта в твердотельных нанопорах. Особенностью протокола 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), а также использование электролита, смешанного с изопропанолом (IPA) для повышения смачиваемости системы при загрузке раствора. Все эти решения помогли устранить проблемы, негативно влияющие на проведение эксперимента, а также обеспечить стабильные измерения.

**В разделе 3.4** приведены результаты по исследованию ионного транспорта в  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  мембранах с нанопорами. Эксперименты проводились с применением разработанной электрохимической ячейки, протокола и методике измерений ионного транспорта. Были использованы мембраны толщиной 40 нм с

одинокими нанопорами диаметром 5 нм. Схема эксперимента аналогично вышеописанной в разделе 2.2, представлена на рисунке 9а.

В ходе экспериментов измерены значения тока, проходящего через нанопору, для электролита KCl в диапазоне концентраций от 0,1 мМ до 1М. На рисунке 9б показана зависимость удельной проводимости нанопоры от концентрации электролита KCl для двух разных нанопор. С увеличением концентрации KCl выше 0,01 М удельная проводимость нанопор увеличивается и достигает значения 7 См/м и 4 См/м при концентрации 1 М. Эта зависимость (в области малых концентраций KCl) может быть объяснена перекрытием двойного электрического слоя (ДЭС), что приводит к появлению заряженной области внутри нанопоры, влияя на ее транспортные свойства. Определен эффективный диаметр поры при концентрации электролита 1М, равный ~5 нм, что хорошо согласуется с результатами ПЭМ. 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.

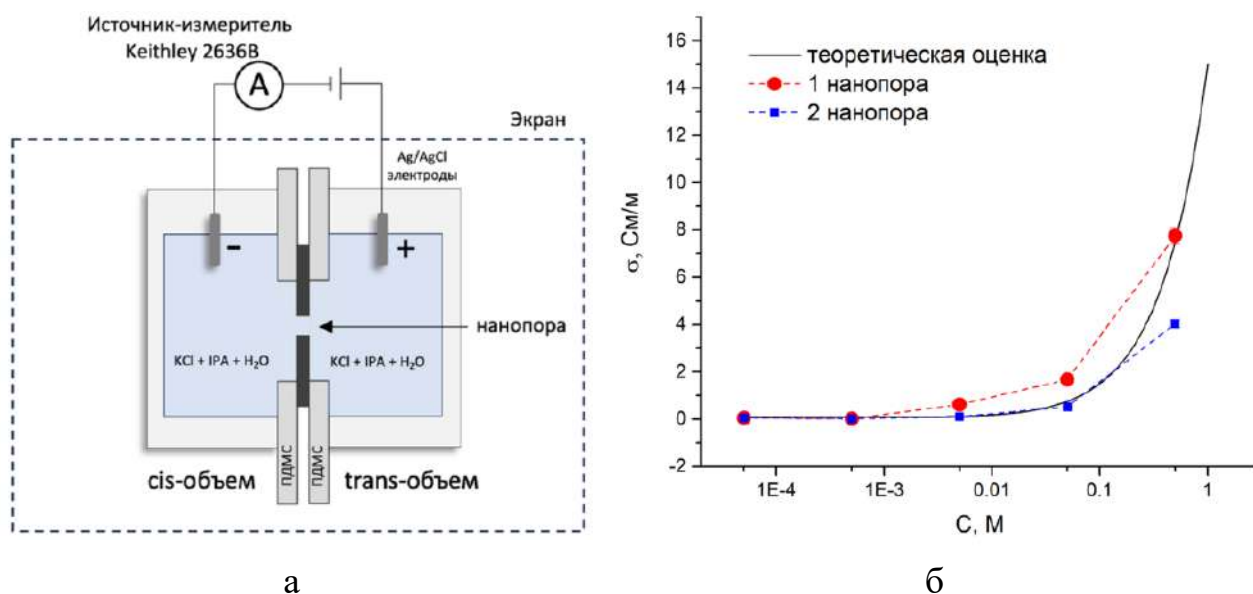


Рисунок 9 – а. Схема эксперимента. б. Зависимость удельной проводимости нанопоры от концентрации электролита KCl для двух разных пор.

**В четвертой главе описаны экспериментальные исследования: выделение и обнаружение нуклеиновых кислот в пробе.**

**В разделе 4.1** исследовалась эффективность выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах в микрофлюидном чипе с целью получения очищенного препарата для дальнейших исследований. Эффективность выделения  $\alpha$  оценена методом полимеразной цепной реакции в реальном

времени (ПЦР-РВ) в ПДМС чипах в сравнении с выделением в пробирке ( $\alpha \approx 28\%$  и  $\alpha \approx 33\%$ ). Выделение в микрофлюидном чипе позволяет автоматизировать процесс, устранить влияния человеческого фактора и может использоваться для получения образцов, подходящих для исследования транспорта НК в наноразмерных структурах.

В разделе 4.2 приведены результаты экспериментов по детектированию молекул ДНК. Схема эксперимента изображена на рисунке 10. В качестве буферного электролита использовался раствор 0,1М KCl и 1 x PBS (1:1 объемных долей) при pH = 7,4. Измерения ионного тока проводились с помощью источника-измерителя напряжения и тока, позволяющего осуществлять измерения с частотой 50 кГц. Проведены эксперименты по регистрации двухцепочечных фрагментов ДНК длиной 10000, 5000 и 500 п.о при прохождении через твердотельную нанопору под действием электрофореза. Для каждой длины фрагментов проводились независимые эксперименты.

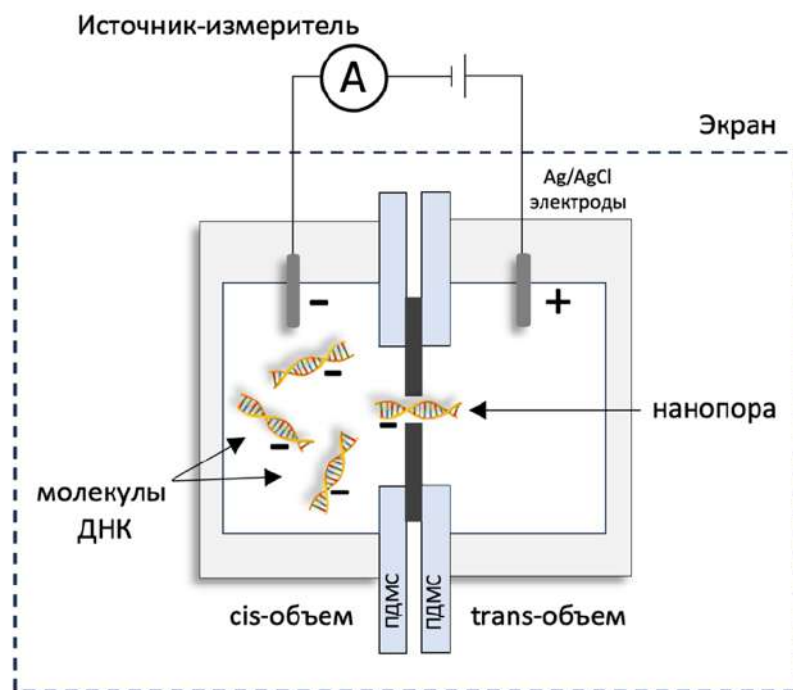


Рисунок 10 – Схема эксперимента

Изменение тока, представляющее собой событие транслокации, показано на рисунке 11а и характеризуется амплитудой (250 пА) и продолжительностью транслокации (0,1 с). Зависимость амплитуды транслокаций от их продолжительности представлена на рисунке 11б. 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. Кроме того, события



после добавления ДНК характеризуются большей амплитудой транслокаций, что может указывать на прохождение через пору крупных молекулярных соединений. Значительный разброс амплитуды и длительности транслокаций для молекул одной длины, вероятно, связан с различной конформацией молекул или фрагментов молекулы (полностью распутанная и частично запутанная) в момент прохождения через внутренний объем поры. Двумерное распределение плотности транслокаций фрагментов ДНК длиной 10000 п.о. показано на рисунке 12а, максимальная плотность распределения выявлена в области коротких продолжительностей транслокаций (до 2 мс), подтверждая природу транслокаций, связанную с высокой скоростью перемещения фрагментов ДНК через нанопору под действием электрофоретических сил. Полученные результаты демонстрируют возможность одномолекулярного детектирования.

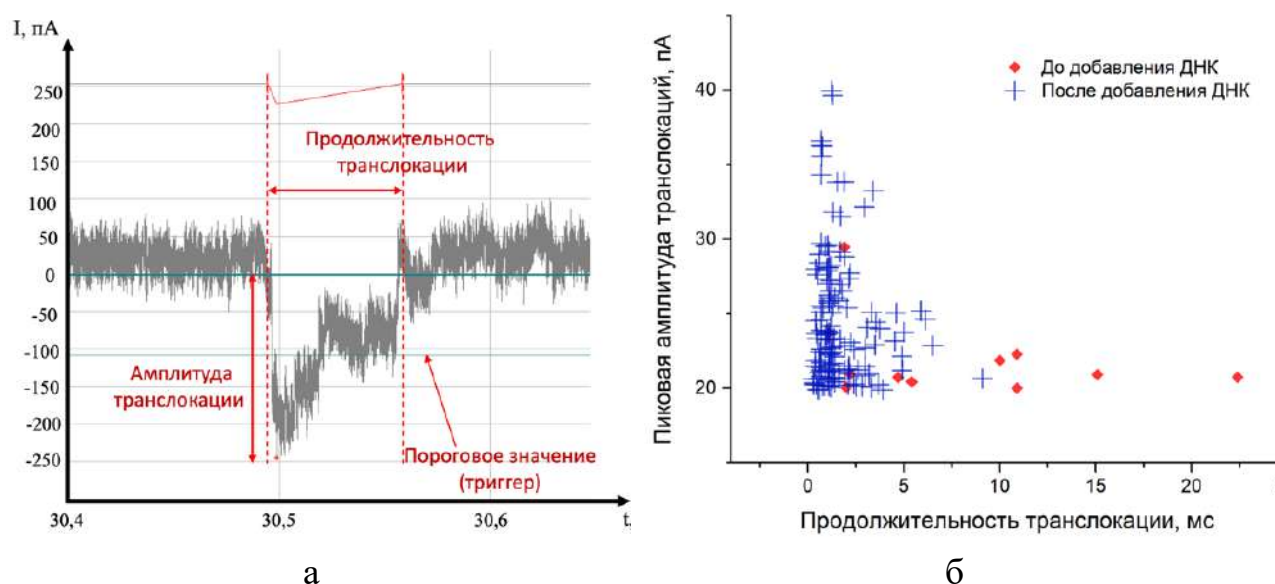


Рисунок 11 – а. Пример события транслокации. б. Зависимость пиковой амплитуды транслокаций от продолжительности транслокаций для фрагментов ДНК 10000 п.о.

Результаты экспериментов по детектированию фрагментов ДНК 5000 и 500 п.о. свидетельствуют о существовании зависимости длительности событий транслокаций от длины молекулы (рисунок 12б). Медианное значение времени транслокаций для 5000 и 500 п.о. составило 1,7 мс и 1,09 мс, соответственно. При уменьшении длины молекул в 10 раз, продолжительность транслокаций снижается на 35%, что демонстрирует возможность различия фрагментов ДНК по длине.

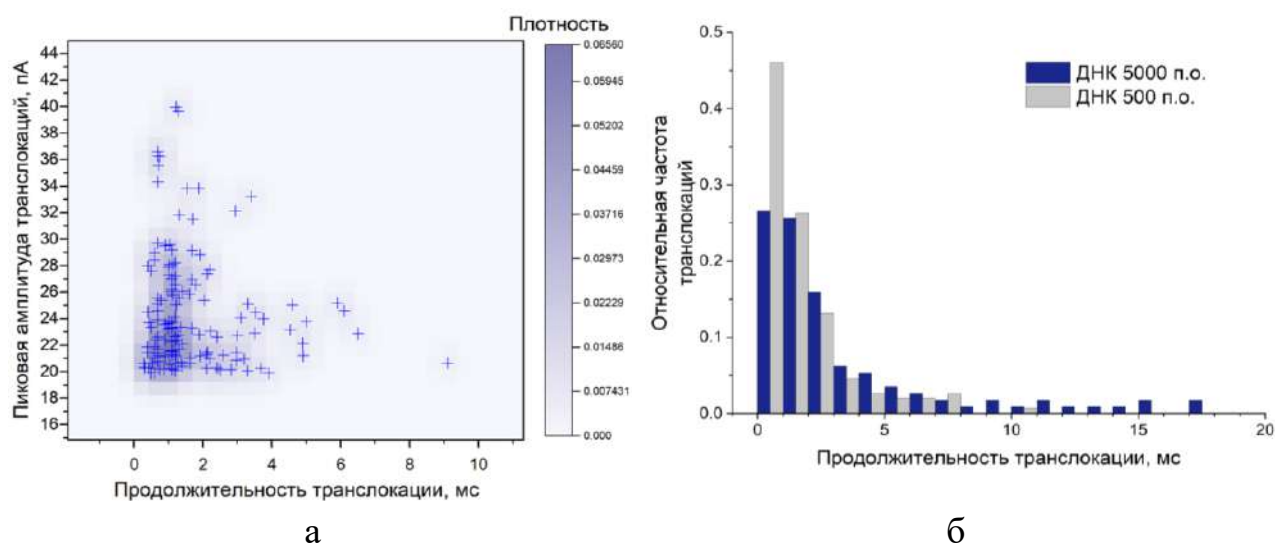


Рисунок 12 – а. Двумерное распределение плотности событий транслокации фрагментов ДНК 10000 п.о. б. Распределение событий транслокаций по продолжительности для молекул ДНК 5000 и 500 п.о.

## **В заключении сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы:**

1 Разработан и апробирован метод изготовления многоразового кремний-стеклянного микрофлюидного устройства с наноканалами заданной геометрией и контролируемыми размерами в котором нано- и микроразмерные структуры формируются методами оптической литографии и травлением сфокусированным ионным лучом, а герметизация устройства осуществляется анодным свариванием, что позволяет создавать многоразовые 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  $\sim 20$  нм и плотность поверхностного заряда внутри канала  $1,5$  мКл/м<sup>2</sup>. 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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  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  $\text{SiN}_x/\text{Si}$  мембране толщиной 40 нм методом измерения ионной проводимости растворов электролита  $\text{KCl}$  в диапазоне концентраций 0,1 мМ до 1 М. Согласно полученным данным с увеличением концентрации  $\text{KCl}$  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  $\text{KCl}$  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%.

#### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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., Евстрапов 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., Евстрапов А.А. Влияние оптического излучения различной длины волны на транспортные характеристики тонких SiN-мембран с интегрированными единичными нанопорами // *Письма в журнал технической физики*, 2023. Т. 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.

**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 MoS<sub>2</sub>nanopores 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/SiO<sub>2</sub> 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.