

Детектирование единичных биомолекул с помощью твердотельного нанопорового SiN/Si-сенсора

© Н.В. Ваулин¹, П.К. Афоничева², Д.В. Лебедев^{1,2}, А.С. Букатин^{1,2}, И.С. Мухин^{1,3}, А.А. Евстарпов²

¹ Санкт-Петербургский Академический университет им. Ж.И. Алфёрова Российской академии наук, 194021 Санкт-Петербург, Россия

² Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, 198095 Санкт-Петербург, Россия.

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

E-mail: nikitavaylin@mail.ru

Поступила в Редакцию 3 мая 2024 г.

В окончательной редакции 1 июля 2024 г.

Принята к публикации 30 октября 2024 г.

Проведена отработка методики иммобилизации одиночных молекул 26S-протеасомы в области твердотельной SiN-нанопоры под действием приложенного электрического поля. Процесс иммобилизации одиночной молекулы 26S-протеасомы приводит к изменению ионного тока через нанопору на 20%. Дальнейшее развитие данной методики может позволить высокоэффективно иммобилизовывать одиночные биомолекулы с целью изучения их конформационной активности.

Ключевые слова: нанопоры, твердотельные нанопоры, нанопоровый сенсор, одномолекулярное детектирование, 26S-протеасома.

DOI: 10.61011/FTP.2024.09.59303.6342A

1. Введение

Развитие методов синтеза твердотельных наноструктур, методов электрического и оптического детектирования, а также технологий молекулярной биологии привело к появлению нового класса высокочувствительных биосенсоров, принцип действия которых основан на взаимодействии биомолекул с наноразмерными структурами. Широкое распространение получили технологии двухэлектродных электрохимических сенсоров [1,2], сенсоров на основе полевых транзисторов [3] и CRISPR устройств [4]. Перспективным направлением развития биосенсоров являются технологии нанопорового детектирования, позволяющие проводить качественный и количественный анализ одиночных биомолекул.

В общем случае нанопоровый сенсор представляет собой тонкую непроницаемую мембрану с интегрированной одиночной наноразмерной порой, которая соединяет два независимых объема буферного раствора электролита. Процесс детектирования заключается в модуляции электропроводности поры проходящими через ее внутренний объем молекулами анализируемого вещества. Величина и длительность изменения проводимости поры (процесса транслокации) зависит от размера, заряда, жесткости и конформационных свойств исследуемой молекулы. Таким образом, измерение ионного тока, протекающего через нанопору, позволяет детектировать, идентифицировать и анализировать молекулярные соединения в сверхмалых концентрациях [5,6].

Нанопоровые сенсоры на основе твердотельных мембран включают в себя широчайший спектр материалов, технологий синтеза и методов применения. Например,

твердотельные нанопоры активно применяются для исследования механизмов ионного транспорта, изучения физико-химических и конформационных свойств белков и нуклеиновых кислот без необходимости предварительной модификации анализируемых веществ [7–9]. Многообещающей является возможность исследования конформационной активности одиночной молекулы, иммобилизованной в области нанопоры под действием электрического поля. Данная работа посвящена разработке методики иммобилизации белковых соединений — 26S-компонентов протеасомы в области твердотельной нанопоры.

2. Материалы и методы

В качестве исследуемых объектов в работе использовались 26S-компоненты протеасом, диссоциировавшие на 20S-компоненты и низкомолекулярные белковые субъединицы. 20S-компоненты протеасом представляют собой высокостабильные белковые молекулы цилиндрической формы диаметром 11.5 и высотой 15 нм. Внутри цилиндра находится сквозная полость переменного диаметра. Изоэлектрическая точка молекулы — 5.5 pH. В используемом буферном растворе молекулы протеасом обладают отрицательным электрическим зарядом.

Используемый в работе нанопоровый образец представляет собой свободно подвешенную SiN-мембрану с интегрированной одиночной наноразмерной порой. Синтез мембраны состоит из нескольких этапов, на первом из которых на отожженной поверхности Si-подложки формируется слой SiN толщиной 30 нм. Рост SiN производится методом газовой эпитаксии при

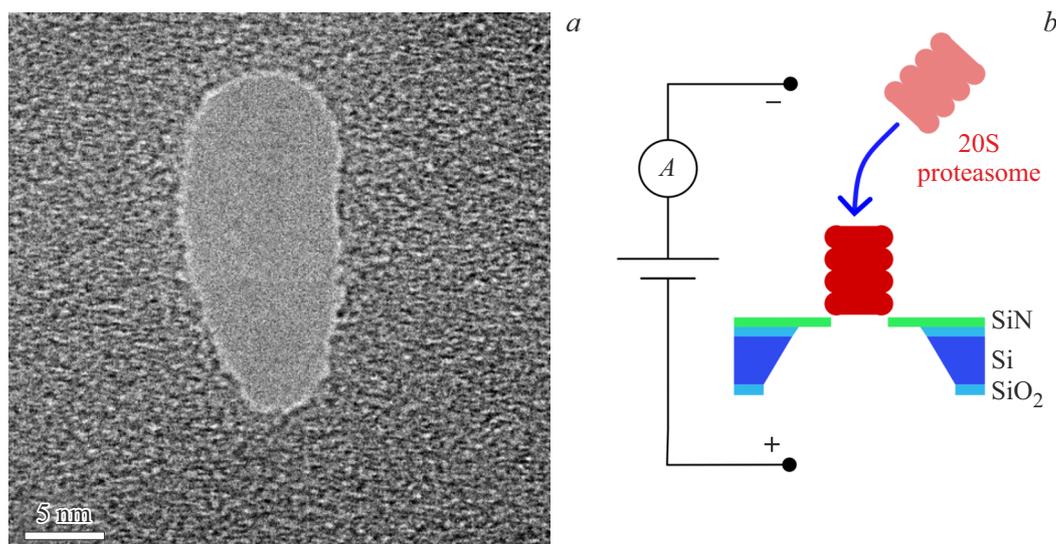


Рис. 1. *a* — ПЭМ-изображение использовавшейся в работе нанопоры; *b* — схема эксперимента по иммобилизации одиночной молекулы 20S-протеасомы. (Цветной вариант рисунка представлен в электронной версии статьи).

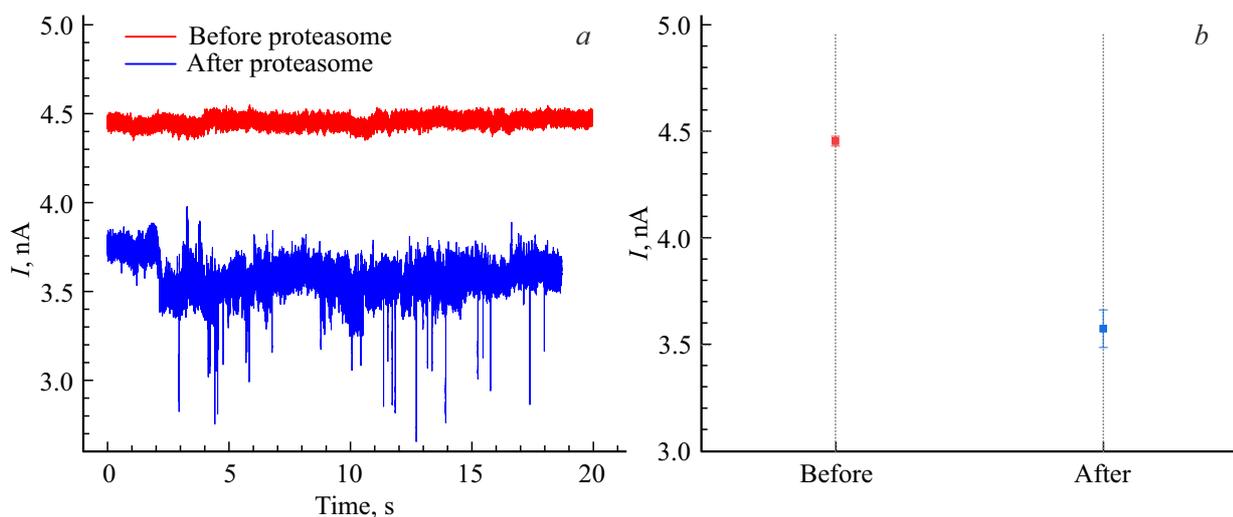


Рис. 2. *a* — примеры 20-секундных токовых кривых до и после добавления молекул протеасом $U = 0.3$ В, частота измерений — 50 кГц; *b* — уровни равновесного ионного тока до и после добавления молекул протеасомы $U = 0.3$ В.

пониженном давлении (LP-CVD). Далее, методами селективного химического и плазмохимического травления Si-подложка удаляется, оставляя свободно подвешенную SiN-мембрану толщиной 30 нм и сторонами 130×130 мкм. В полученной мембране методом литографии сфокусированным электронным пучком создается одиночная нанопора овальной формы 10×20 нм (рис. 1, *a*). Размер нанопоры обусловлен линейными размерами исследуемых молекул — белки должны быть иммобилизованы в области поры, но не должны проходить через ее внутренний объем.

Для проведения экспериментов по иммобилизации молекул протеасом была разработана измерительная ячейка, состоящая из двух объемов (половинок), в каждую из которых устанавливаются измерительные Ag/AgCl-

электроды и капилляры для подачи/отвода буферного раствора электролита. При сборке нанопоровый образец фиксируется между объемами ячейки с помощью полимерных прокладок, после чего ячейка заполняется буферным раствором. Используемый в работе буферный раствор электролита представляет собой смесь 0.1 М KCl и 1 X PBS (1 : 1), pH = 7.4. Для измерения ионного тока применяется самодельный источник-измеритель напряжения и тока, позволяющий проводить измерения с частотой до 50 кГц.

3. Эксперимент

На первом этапе было проведено измерение величины ионного тока через нанопору в чистом буферном растворе

ре без добавления молекул протеасом. На полученной токовой кривой, представленной на рис. 2, *a* (синяя кривая), отсутствуют скачкообразные изменения уровня тока, которые можно интерпретировать как блокировку поры и (или) прохождение через нее молекул большого размера. Значение ионного тока составило 4.46 нА ($U = 0.3$ В). После этого в отрицательно заряженный объем ячейки были добавлены молекулы протеасом в концентрации 5 нМ. Под действием приложенного электрического поля отрицательно заряженные молекулы перемещаются к положительно заряженному объему ячейки через нанопору. Поскольку малые размеры нанопоры не позволяют молекулам протеасом пройти через ее внутренний объем, мы ожидаем, что одна из молекул будет иммобилизована в области поры. Процесс иммобилизации должен сопровождаться изменением конфигурации двойных электрических слоев в области входа в нанопору, что скажется на транспортных характеристиках всей системы. После добавления молекул протеасом в объем измерительной ячейки ионный ток через нанопору снизился на 20% и составил 3.58 нА (рис. 2, *b*). Более того, на полученной токовой кривой наблюдаются резкие скачкообразные изменения уровня ионного тока (см. рис. 1, *a*).

Мы предполагаем, что общее изменение уровня ионного тока связано с частичным перекрытием внутреннего объема поры иммобилизованной молекулой протеасомы. В то же время ионный и молекулярный транспорт через нанопору сохраняется, чему свидетельствуют скачкообразные изменения уровня тока. Появление таких кратковременных изменений тока может быть связано с прохождением через внутренний объем поры низкомолекулярных белковых фрагментов, оставшихся после диссоциации части молекул протеасом.

4. Заключение

В ходе данной работы была проведена отработка методики иммобилизации одиночных молекул 20S-протеасомы в области твердотельной SiN-нанопоры под действием приложенного электрического поля. Дальнейшее развитие данной методики может позволить высокоэффективно иммобилизовывать одиночные биомолекулы с целью изучения их конформационной активности.

Финансирование работы

Исследования транспорта белков были выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10117). Синтез полупроводниковых образцов был выполнен при поддержке проекта Министерства науки и высшего образования РФ FSRM-2023-0007.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A. Victorious, Z. Zhang, D. Chang, R. Maclachlan, R. Pandey, J. Xia, J. Gu, T. Hoare, L. Soleymani, Y. Li. *Angewandte Chemie*, **134** (31), e202204252 (2022).
- [2] V. Clark, K. Waters, B. Orsburn, N.N. Bumpus, N. Kundu, J.T. Sczepanski, P. Ray, N. Arroyo-Currás. *Angewandte Chemie*, **134** (45), e202211292 (2022).
- [3] E. Macchia, K. Manoli, B. Holzer, C. Franco, M. Ghittorelli, F. Torricelli, D. Alberga, G. Mangiatordi, G. Palazzo, G. Scamarcio, L. Torsi. *Nature Commun.*, **9** (1), 3223 (2018).
- [4] R. Zhu, H. Jiang, C. Li, Y. Li, M. Peng, J. Wang, Q. Wu, C. Yan, Q. Bo, J. Wang, C. Shen, P. Qin. *Anal. Chimica Acta*, **1257**, 341175 (2023).
- [5] L. Xue, H. Yamazaki, R. Ren, M. Wanunu, A.P. Ivanov, J.B. Edcl. *Nature Rev. Mater.*, **5** (12), 931 (2020).
- [6] D. Branton, D. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. Benner, T. Butler, M. Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, S. Jovanovich, P. Krstic, S. Lindsay, X. Ling, C. Mastrangelo, A. Meller, J. Oliver, Y. Pershin, J. Ramsey, R. Riehn, G. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, J. Schloss. *Nature Biotechnol.*, **26** (10), 1146 (2008).
- [7] J. Fu, L. Wu, G. Hu, F. Li, Q. Ge, Z. Lu, J. Tu. *Analyst*, **147** (13), 3087 (2022).
- [8] K. Sethi, G.P. Dailey, O.K. Zahid, E.W. Taylor, J.A. Ruzicka, A.R. Hall. *ACS Nano*, **15** (5), 8474 (2021).
- [9] N.V. Vaulin, P.K. Afonicheva, D.V. Lebedev, A.S. Bukatin, I.S. Mukhin. *St. Petersburg State Polytech. Univ. J. Phys. Math.*, (1), 385 (2023).

Редактор Г.А. Оганесян

Detection of single biomolecules using a solid-state nanopore SiN/Si sensor

N.V. Vaulin¹, P.K. Afonicheva², D.V. Lebedev^{1,2}, A.S. Bukatin^{1,2}, I.S. Mukhin^{1,3}, A.A. Evstrapov²

¹ Alferov St. Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, 194021 St. Petersburg, Russia

² Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, 198095 St. Petersburg, Russia

³ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251 St. Petersburg, Russia

Abstract Developed a technique for immobilizing single molecules of the 26S proteasome in the region of a solid-state SiN nanopore under the action of an applied electric field. The process of immobilization of a single molecule of the 26S proteasome leads to a change in the ion current through the nanopore by 20%. Further development of this technique may allow highly efficient immobilization of single biomolecules in order to study their conformational activity.