

УДК 543.424.2

## РАЗРАБОТКА ГКР-АКТИВНЫХ ТРЕКОВЫХ МЕМБРАН С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

© 2025 г. Д. С. Тихонова<sup>1,\*</sup>, Е. В. Андреев<sup>2</sup>, Р. Ш. Алиева<sup>1</sup>, С. В. Дубков<sup>3</sup>,  
В. С. Колмогоров<sup>1,4</sup>, А. С. Ерофеев<sup>4</sup>, А. Н. Нечаев<sup>2</sup>,  
В. И. Кукушкин<sup>5</sup>, Е. Г. Завьялова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Химический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup>Международная межправительственная организация «Объединенный институт ядерных исследований», Дубна, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники», Москва, Россия

<sup>4</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

<sup>5</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики твердого тела имени Ю.А. Осипьяна Российской академии наук, Черноголовка, Россия

\*E-mail: daria.tikhonova@chemistry.msu.ru

Поступила в редакцию 27.09.2024 г.

После доработки 18.10.2024 г.

Принята к публикации 28.10.2024 г.

Рассмотрены различные подходы для создания усиливающей поверхности на основе полиэтилен-терефталатной трековой мембраны. Стабильность покрытия и потенциал применения полученных субстратов оценивали на примере аптасенсора для определения вируса гриппа А.

**Ключевые слова:** гигантское комбинационное рассеяние, 3D субстраты, трековые мембраны, напыление, аптамеры, вирус гриппа А, аптасенсор.

DOI: 10.31857/S0367676525020178, EDN: CWINBV

### ВВЕДЕНИЕ

Метод гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), являющийся специфической разновидностью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), на сегодняшний день, стал одним из самых многообещающих и популярных аналитических подходов. Как и в классической КР-спектроскопии, ГКР-спектроскопия предоставляет информацию о колебательных модах молекулы в виде уникального спектра «отпечатка пальцев». Однако отличительной особенностью этого метода является необходимость адсорбции аналита на шероховатой наноструктурированной поверхности серебра, золота или меди, что создает значительное электромагнитное усиление интенсивности КР-сигнала до  $10^3$ – $10^9$  и обеспечивает определение веществ в особо низких концентрациях [1]. Для повышения селективности определения активно разрабатываются подходы с использованием модификации ГКР-поверхности узнающими элементами, например,

антителами или аптамерами. ГКР-сенсоры нашли широкое применение в различных аналитических подходах для детекции мишеней разной природы.

Принято выделять три основные группы ГКР-активных субстратов: коллоидные наночастицы, двумерные субстраты и трехмерные. Основным требованием к хорошему ГКР-субстрату является наличие большого количества активных «горячих точек», в которых происходит электромагнитное усиление сигнала. Для достижения этого эффекта прибегают к созданию шероховатых поверхностей сложной кластерной структуры. Однако при применении этих субстратов в аналитических целях появляются еще такие важные требования, как: гомогенность размера, формы, устойчивость к агрегации, а также воспроизводимость поверхности и долгое время жизни [1]. Частой проблемой ГКР-субстратов стала нестабильность поверхности при взаимодействии с аналитом, солями буферного раствора или биологическими жидкостями, что дополни-

тельно накладывает свои ограничения при разработке сенсоров [2].

Одним из самых простых в исполнении и дешевых методов создания ГКР-субстратов является синтез коллоидных наночастиц серебра или золота. Из основных плюсов этого подхода можно выделить несложный контроль размера и формы частиц, а также возможность синтеза частиц композитного и многофункционального состава, например, сплава Ag с Au или инкапсулированных наночастиц с металлическим ядром и защитной оболочкой из графена или силиката, а также сложной структуры: нанозвезд, нанопризм или нанокубиков [1]. Несмотря на то, что такие коллоидные наночастицы способны обладать достаточным коэффициентом усиления, их главной слабостью остается невоспроизводимость и склонность к агрегации, что приводит к низкой гомогенности и ограниченной применимости субстратов для детекции аналитов.

Переход от коллоидных наночастиц к твердым планарным 2D и 3D субстратам позволил частично решить проблему неконтролируемой агрегации во время определения и воспроизводимости поверхности. Двумерные ГКР-активные материалы на основе графена, нитрида бора, дисульфида молибдена показали себя отличными кандидатами в качестве ГКР-субстрата. Повысить плазмонный коэффициент усиления можно за счет создания композитных структур, внедряя наночастицы Ag, Au или Cu в матрицу графена, которая одновременно является и ГКР-активным материалом, и стабилизатором частиц [3].

Однако наибольшее внимание исследователей привлекают трехмерные субстраты благодаря своему разнообразию и большому количеству методов получения. В целом, разработку 3D ГКР-субстрата можно разделить на два важных аспекта: это создание основы будущей подложки и нанесение наноструктурированного металлического слоя. В качестве базового материала основы наиболее популярны оксид кремния и его производные, например, полидиметилсилоксан, керамические матрицы на основе алюминия, целлюлоза, различные полимерные пленки (полиэтилентерефталат, полиамиды, полианилины) [4] и даже модифицированные ткани. Структура поверхности матрицы под ГКР-субстрат имеет большое значение, поскольку может также внести вклад в усиление сигнала. Так, дорогой, но быстрый и с крайне высокой воспроизводимостью метод сканирующей нанолитографии позволяет получить нанопериодические силикатные подложки требуемой структуры и размера под дальнейшее нанесение слоя металла [5]. А сложная матрица на основе волокон шелка после инкорпорирования в структуру наночастиц Ag способна создавать достаточное для аналитических применений усиление сигнала.

Особое внимание уделяется и методу создания металлической поверхности: он определяет не только усиление, но и гомогенность поверхности и ее устойчивость. Одним из популярных подходов является модификация матрицы подложки коллоидными наночастицами с помощью адсорбции. Чаще всего используют матрицы на основе 3-аминопропил(диэтоксид)метилсилан и 3-меркаптопропилтриметоксисилан для ковалентной иммобилизации наночастиц Ag или Au на поверхности. Этот метод позволяет использовать наночастицы самой разной морфологии, довольно прост, однако срок работы таких подложек ограничивается тремя месяцами, и однородность поверхности сложно достижима [6]. Альтернативой методу химического осаждения наночастиц является физическое напыление металла, и самые распространенные из них — это термическое вакуумное и магнетронное напыления. Обычно физическое напыление создает гладкую металлическую поверхность, именно поэтому при использовании данных подходов необходима заранее подготовленная сложная наноструктурированная матрица. Однако среди главных преимуществ выделяются высокий контроль процесса создания металлического слоя с точностью до нескольких нанометров и его воспроизводимость, также эти методы широко масштабируемы. Требуемая морфология и свойства поверхности задаются за счет различных параметров, таких как: толщина слоя металла, угол и скорость напыления, вращение матрицы, последующий отжиг или включение добавочных слоев для увеличения адгезии [7].

При разработке ГКР-сенсоров возникла потребность в использовании субстратов на основе мембран, благодаря их высокой гибкости, полупроницаемости, способности к фильтрации и концентрированию аналита. В качестве основ под такие пленки применяются полидиметилсилоксан, полиметилметакрилат, полиэтилентерефталат и другие полимерные носители, обладающие высокой адгезией [8]. Для создания ГКР-поверхности на пленках используют все вышеперечисленные стратегии. Популярным для получения шероховатой поверхности является травление напыленного слоя металла с помощью электрохимического травления или техник нанолитографии. Однако возможно получить и полимерный носитель с требуемой сложной морфологией поверхности путем облучения заряженными частицами и последующим химическим травлением в щелочи. Полученные таким методом трековые мембраны обладают уникальной сложной, но в то же время периодической и однородной структурой поверхности и способны служить базой для создания ГКР-субстрата. Помимо этого, наличие пор с контролируемым размером расширяет возможности применения мембран в сенсорных подходах. Так, в работах [9–11]

были разработаны и использованы полиэтилен-терефталатные трековые мембраны с термическим напылением серебра, модифицированного ДНК-аптамерами, связывающими вирусы гриппа А. Тем не менее, воспроизводимость работы сенсоров на основе ГКР-субстратов и создание однородных поверхностей остается все еще нерешенным вопросом и требует дальнейшего исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Неорганические соли, цитрат натрия, изопропиловый спирт и разветвленный полиэтиленмин (массой 60 000 г/моль) были приобретены у компаний AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany) и Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States). ДНК-аптамер RHA0385 со следующими модификациями был синтезирован компанией Synthol (Москва, Россия): (SH-dT)-5'-TTGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTT-3'-Cu<sub>3</sub>, где Cu<sub>3</sub> — флуорофор цианиновый 3, а SH-dT — тимидин с тиольной группой. Растворы готовили в ультрачистой воде с удельным сопротивлением 18.2 МОм.

Вирус гриппа А подтипа H3N2 (штамм A/duck/Moscow/4524/2011) и вирус болезни Ньюкасла NDV (вакцинный штамм) культивировали в аллантоисной полости 10-дневных куриных яиц. Яйца инкубировали при температуре 37°C, охлаждали до 4°C спустя 48 ч после заражения, далее аллантоисную жидкость собирали через 16 ч. Вирус содержащую аллантоисную жидкость инактивировали добавлением 0.05 об. % глутарового альдегида и консервировали добавлением 0.03 мас. % NaN<sub>3</sub>, хранили при температуре +4°C. Далее вирус отфильтровали от примесей и перевели в раствор PBS буфера с pH 7.4. Титр вируса определяли с помощью реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 0.5%-ной суспензии эритроцитов цыплят в 0.14 М растворе NaCl.

### *Облучение полиэтилентерефталатной пленки*

Полиэтилентерефталатную пленку толщиной 23 мкм (Mitsubishi Polyester Films) облучали на ускорителе ИЦ-100 (Дубна, ОИЯИ) ионами He<sup>+26</sup> с энергией 1.2 МэВ, с двух сторон. С нижней стороны облучение проводили под углами к нормали ±30°, с плотностью треков 10<sup>7</sup> см<sup>-2</sup>. С верхней стороны облучение проводили под углом к нормали ±60°, с плотностью треков 5 · 10<sup>8</sup> см<sup>-2</sup>.

### *Получение трековых мембран с развитой поверхностью*

Облученную тяжелыми ионами полиэтилентерефталатную пленку сенсибилизировали ультрафиолетовым излучением в течение 30 мин с каждой стороны и травили в 3 М NaOH при температуре 70°C в течение 10, 15, 20, 25 мин.

## *Получение ГКР-активного слоя*

ГКР-активный слой получали разными методами, во-первых, за счет напыления серебряных пленок методами термического и магнетронного напыления на развитую поверхность трековой мембраны. И, во-вторых, за счет синтеза наночастиц серебра непосредственно на всей поверхности трековых мембран.

### *Термическое напыление серебра*

Напыление проводили на системе нанесения тонких пленок NANO 38 (Kurt J. Lesker Company, Джефферсон-Хиллз, Пенсильвания, США), последовательно наносили слой хрома 1 нм, слой серебра 20 нм. Оба слоя напыляли при давлении 8 · 10<sup>-7</sup> Торр со скоростью осаждения 0.4 А/с.

### *Магнетронное напыление серебра*

Напыление проводили на установке магнетронного напыления Q 150 S, наносили слой серебра 20 нм, при остаточном давлении Ar (10<sup>-2</sup> мБар), со скоростью напыления 14 нм/мин.

### *Синтез наночастиц на поверхности трековых мембран*

Предварительно трековые мембраны модифицировали полиэтиленмином по методике, представленной в работе [12]. Трековые мембраны отмывали в воде и изопропиловом спирте, обрабатывали 0.1 % раствором полиэтиленмина в течение 2 часов, промывали в воде и в растворе цитрата натрия с концентрацией 10<sup>-3</sup> М. Для получения наночастиц серебра модифицированные трековые мембраны вносили в 35 мл цитрата натрия с концентрацией 10<sup>-3</sup> М, нагревали до 95°C, приливали по каплям 20 мл нитрата серебра с концентрацией 10<sup>-3</sup> М и продолжали нагревание в течение 30 минут в атмосфере аргона.

### *ГКР-аптасенсор для определения вируса гриппа А*

Для создания активной конформации аптамер в концентрации 200 нМ в PBS буфере предварительно нагревали при 95°C в течение 5 минут, а затем охлаждали до комнатной температуры. Далее осуществляли иммобилизацию аптамера на поверхность мембраны, инкубируя в течение 15 минут. Следующий этап заключался в фильтрации образца с вирусом через кружок мембраны диаметром 3 мм, помещенный в пробирку с блоком для фильтрования (Corning Costar Spin-X centrifuge tube) с размером пор 0.45 мкм. Вирус гриппа А и контрольный вирус NDV были разбавлены в 10<sup>2</sup>–10<sup>6</sup> раз. 200 мкл образца фильтровали через мембрану с помощью Microspin FV-2400 (Biosan, Рига, Латвия) в течение 2 минут с скоростью 2400 об./мин. Спектры ГКР регистрировали в течение 2000 мс с усреднением по 10 повторов с использованием твердотельного

КР-спектрометра Inspector SERS R532 (Enhanced Spectrometry, Meridian, ID, США) с длиной волны лазера 532 нм. Диаметр луча составлял 2 мм.

#### *Растровая электронная микроскопия*

Морфологию поверхности трековых мембран исследовали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) на микроскопах S-3400N (Hitachi) и SU 8020 (Hitachi) в режиме вторичных электронов. Для улучшения разрешения на образцы напыляли 5 нм слой сплава платины и палладия. Для получения сколов образцы трековых мембран облучали ультрафиолетовым излучением до охрупчивания. Также перед исследованием сканирующей ион-проводящей микроскопией морфологию трековых мембран изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Helios G4 CX (FEI company, США). Измерения проводились при ускоряющем напряжении около 5 кВ и токе 86 пА.

#### *Сканирующая ион-проводящая микроскопия (СИПМ)*

Для сканирования топографии образцов использованы нанокапилляры изготовленные из боросиликатного стекла, с внутренним диаметром 0.6 мм, и внешним диаметром 1.2 мм, длиной 7.5 см. Нанокапилляры заданного размера получены с использованием CO<sub>2</sub>-лазерного пуллера P-2000 (Sutter Instrument, США). Для получения нанокапилляров с радиусом 45–50 нм использована следующая двухступенчатая программа: 1) нагрев = 330, филамент = 3, скорость = 40, задержка = 145, вытягивание = 0; 2) нагрев = 330, филамент = 3, скорость = 40, задержка = 145, вытягивание = 200. Размеры полученных нанокапилляров рассчитаны с помощью следующей теоретической модели:

$$r = \frac{I}{V \tan(\alpha) \pi k}, \quad (1)$$

где  $I$  — величина ионного тока, протекающего через острие нанокапилляра,  $V$  — приложенное напряжение,  $\alpha$  — угол апертуры нанокапилляра,  $k$  — электрическая проводимость электролита, в котором находится нанокапилляр. Так, нанокапилляр был заполнен раствором Хэнкса и помещен в держатель нанокапилляра. Далее, внутрь нанокапилляра был помещено Ag/AgCl электрод для создания ионного тока. Нанокапилляр был подведен к поверхности раствора Хэнкса для измерения величины ионного тока. Диапазон размеров нанокапилляров от 45–50 нм соответствовал 1900–2200 пА. Сканирование проведено в режиме «hopping mode» с амплитудой перемещения по оси  $Z$  — 2000 нм. Расстояние между измеряемыми точками поверхности составило 250 нм. Количество пикселей в кадре — 256 на 256 пикселей. Скорость нагружения нанокапилляра к поверхности составила 10 мкм/с.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

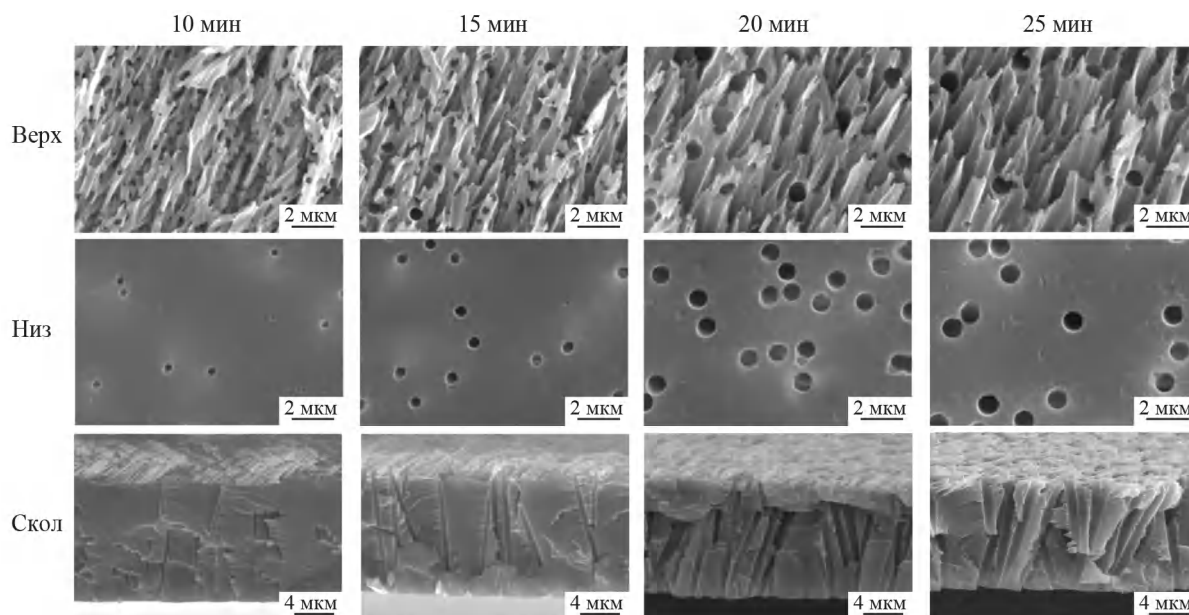
Спектроскопия ГКР является высокочувствительным методом, но ему присущи такие недостатки как сложности с получением воспроизводимых ГКР-субстратов и, в случае использования планарных систем из наночастиц серебра, деградация поверхности. Кроме того, высокая чувствительность может являться и недостатком в случае низкой селективности. В связи с этим, в работе была предложена методика получения трековых мембран с развитой поверхностью (3D-поверхность). Функционализация мембраны аптамерами позволяет специфически связывать аналиты из сложных смесей. Аптамеры были модифицированы тиольной группой для посадки на поверхность металла, а также резонансным красителем, Су3, интенсивность спектра которого позволяет оценить количество аналита (данный подход подробно описан ранее [8]). В свою очередь получение развитой поверхности на трековых мембранах повысит чувствительность подложки.

#### *Получение трековой мембраны с развитой поверхностью*

Трековые мембраны получают за счет облучения полимерной пленки тяжелыми ионами и дальнейшего растравливания треков. Данный подход можно использовать не только для получения пор в пленке, но и для создания рельефа на поверхности мембраны. Для этого полиэтилен-терефталатную пленку облучали с двух сторон, при этом второе облучение проводили с большим флюенсом и большим углом вхождения ионов. Увеличение угла позволяло уменьшить глубину проникновения ионов в полимер, а за счет увеличения флюенса, после травления пленки происходило образование «шипов», так как поверхность с этой стороны растравливалась быстрее.

После облучения пленку сенсibilizировали ультрафиолетовым излучением и травили в NaOH в течение 10, 15, 20, 25 мин. Полученные образцы трековых мембран и их сколы исследовали с помощью РЭМ (рис. 1).

На рисунке 1 можно наблюдать, что с нижней стороны мембраны, где плотностью треков составляла  $10^7 \text{ см}^{-2}$ , на протяжении всего времени травления практически не образуется сдвоенных пор, а их диаметр после 25 мин составлял 1.4 мкм. При этом с верхней стороны мембраны плотность треков составляла  $5 \cdot 10^8 \text{ см}^{-2}$ , в связи с чем, верхняя часть мембраны начинает разрушаться быстрее и после 10 мин травления треки растравились настолько, что начали пересекаться, а после 15 мин травления происходило образование шипов на поверхности мембраны. На микрофотографиях сколов мембран можно наблюдать разницу в глубине захождения ионов в зависимости от угла вхождения, при этом увеличение угла сместило линию пересечения треков



**Рис. 1.** Микрофотографии поверхности трековых мембран в зависимости от времени травления. Микрофотографии получены с помощью РЭМ, приведены нижняя, верхняя стороны мембраны и со стороны скола.

в верхнюю часть, что увеличивало толщину итоговой мембраны.

Предполагалось, что создание рельефа на поверхности трековой мембраны позволит получить эффект ГКР света на углах и вершинах рельефа или усилить сигнал от наночастиц за счет более развитой поверхности.

#### *ГКР-активные трековые мембраны*

Получение эффекта ГКР света на трековых мембранах проводилось тремя способами: с помощью термического напыления, с помощью магнетронного напыления и с помощью синтеза наночастиц серебра на поверхности мембран.

Наночастицы серебра получали за счет восстановления нитрата серебра цитратом натрия непосредственно на мембране. Первоначально на поверхности полиэтилентерефталаты трековых мембран присутствуют только карбоксильные и гидроксильные группы, закрепление наночастиц на которых не происходило. Поэтому образцы трековые мембраны обрабатывали полиэтиленгликолем, чтобы перезарядить и функционализировать поверхность мембран. В составе полиэтиленгликоля имеется большое количество аминогрупп, у которых большое сродство как к серебру, так и к поверхности мембраны.

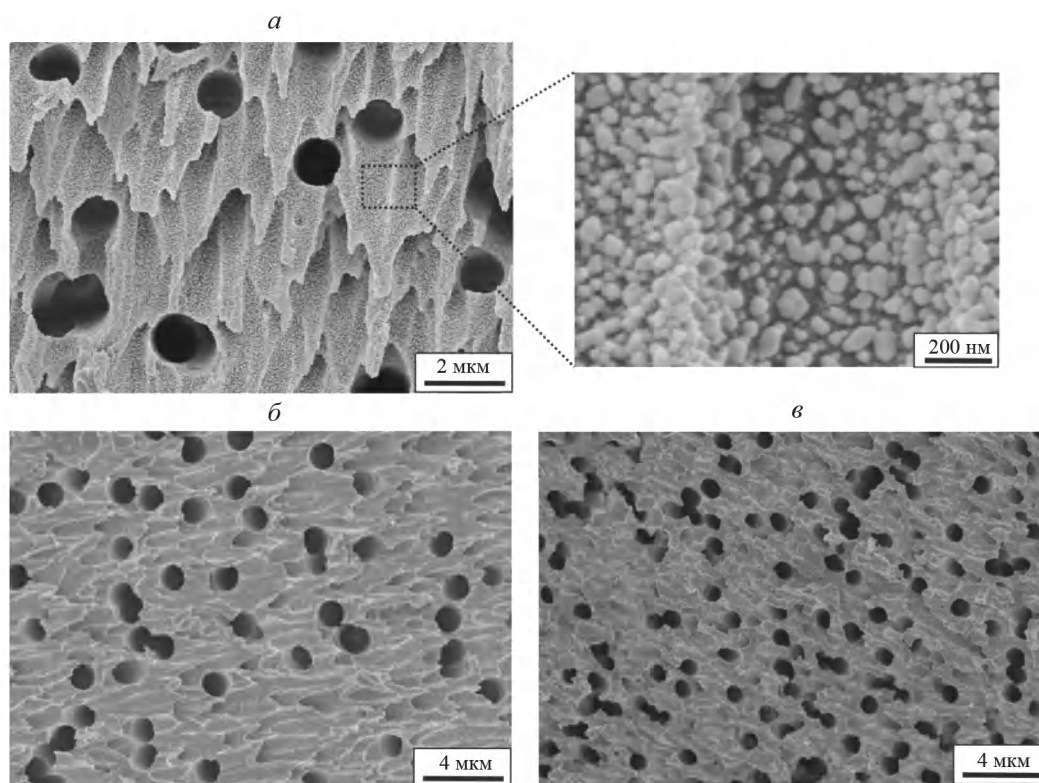
Для повышения воспроизводимости и масштабируемости технологии в качестве методов получения эффекта ГКР рассматривались методы вакуумного напыления, а именно метод термического напыления и метод магнетронного напыления. С их помощью на трековые мембраны напыляли серебряные пленки толщиной 20 нм. В случае термического напыления еще ис-

пользовали слой хрома, для повышения адгезии серебра.

На рис. 2 представлены микрофотографии поверхности полученных ГКР-активных трековых мембран. Можно наблюдать, что наночастицы серебра, полученные цитратным методом, сформировались на всей поверхности трековой мембраны (рис. 2а), в том числе и в порах. Средний размер наночастиц серебра, полученный по микрофотографиям, составил  $40 \pm 15$  нм. Сравнивая между собой пленки, полученные методами магнетронного (рис. 2б) и термического (рис. 2в) напылений, можно отметить, что в обоих случаях напыление прошло однородно, но на микрофотографии пленки серебра, полученной с помощью термического напыления, можно наблюдать деформацию шипов. Данное явление можно связать с термическим воздействием во время напыления пленок. При этом на поверхности трековой мембраны с пленкой серебра, полученной с помощью магнетронного напыления, деформации шипов не наблюдалось.

#### *ГКР-аптасенсор для определения вируса гриппа А*

В данной работе был использован тот же принцип работы аптасенсора, как и в предыдущих исследованиях [8]. Изменение положения метки СуЗ в результате связывания аптамером вируса гриппа А непосредственно влияет на интенсивность ГКР-сигнала. Несмотря на то, что интенсивность сигналов ГКР и поверхностно-усиленной флуоресценции при разбавлении вируса меняется немонотонно, наблюдается, что сигнал в присутствии вируса гриппа А ниже, чем в контрольных образцах без целевого виру-



**Рис. 2.** Микрофотографии поверхностей трековых мембран с ГКР-слоем, полученные спомощью РЭМ: с цитратными наночастицами серебра (а), напыленными пленками серебра магнетронным (б) и термическим (в) методами.

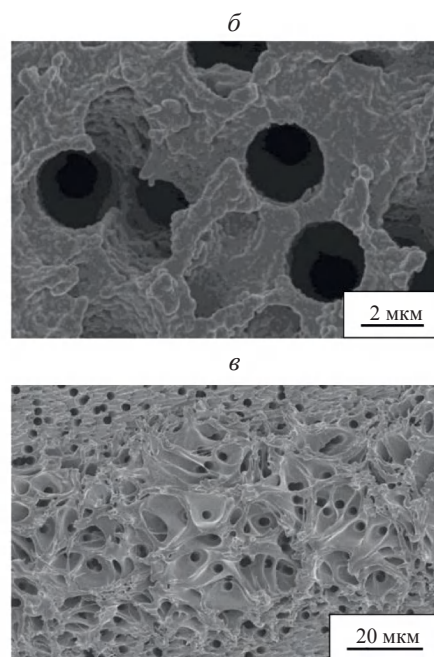
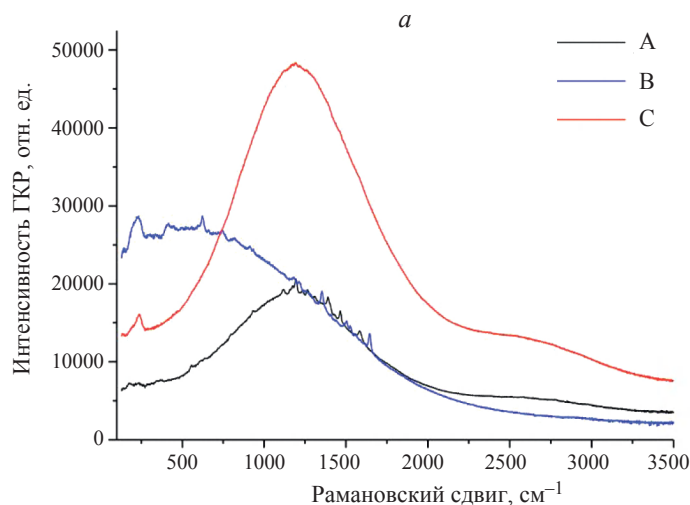
са. Предполагается, что вирус гриппа А при связывании со специфичным аптамером экранирует метку от поверхности, тем самым снижая интенсивность сигнала.

При разработке и оптимизации данного аптасенсора были протестированы 3 типа трековых мембран. Выбор способа создания поверхности чрезвычайно важен, поскольку такие мембраны крайне чувствительны к солям буфера и биологическим жидкостям. На рис. 3 представлены ГКР-спектры мембран для контрольного вируса NDV при концентрации  $1.36 \cdot 10^5$  вир. частиц/мл. Можно наблюдать, что у мембраны С, полученной термическим напылением, практи-

чески отсутствует ГКР-сигнал. Вероятнее всего это связано с тем, что при термическом напылении нарушается морфология шипов, и снижается ГКР-сигнал. Несмотря на то, что мембрана В, полученная цитратным осаждением дала наиболее высокий ГКР-сигнал, ее поверхность оказалась неоднородной, что сказалось в очень низкой воспроизводимости работы сенсора. Как видно из табл. 1, наиболее удовлетворительные результаты показала мембрана А с магнетронным напылением поверхности. Условия, используемые при данном типе напыления являются более мягкими, поскольку пленка не нагревается в процессе обработки, не искажает структуру исходной по-

**Таблица 1.** ГКР-активность мембран после фильтрации биологической жидкости. Интенсивности ГКР-спектров и поверхностно-усиленной флуоресценции мембран, функционализированных аптамером с введенной меткой  $\text{Cu}3$ , в отн. ед.; RSD%, относительное стандартное отклонение для повторяемых экспериментов. Данные получены для контрольных опытов с фильтрацией вируса NDV в концентрации  $1,2 \cdot 10^5$  вир. частиц/мл.

Мембрана	Способ создания поверхности	Интенсивность		RSD, %		
		ГКР, $1462 \text{ см}^{-1}$	флуор, $1156 \text{ см}^{-1}$	флуор	ГКР	ГКР/ флуор
А	магнетронное напыление	1288	14678	42	43	30
В	цитратное осаждение	1438	37480	50	125	98
С	термическое напыление	145	39995	59	50	55



**Рис. 3.** Сравнение работы мембран разных типов на примере аптасенсора для определения вируса гриппа А. ГКР-спектры мембран после фильтрации контрольного вируса, NDV, в концентрации  $1.2 \cdot 10^5$  вир.ч./мл (*а*); Микрофотографии РЭМ поверхности мембран после проведения опыта: потеря структуры шипов в результате термического напыления (*б*), плавление мембраны с магнетронным напылением под действием лазера в результате измерения (*в*).

лимерной мембраны, однако и не создается поверхность с высоким ГКР-эффектом. Между разными образцами присутствует погрешность отношения интенсивности ГКР-спектров к флуоресценции порядка 30 %. Величина погрешности может быть обусловлена перегревом и локальным плавлением мембраны под воздействием лазера спектрометра во время измерения, как это наблюдается на рис. 3в.

Для мембраны, полученной магнетронным напылением и показавшей наилучшую воспроизводимость сенсора, получены следующие результаты, представленные в табл. 1. На ГКР-спектрах образцов с целевым и нецелевым вирусами присутствует статистически значимое отличие в интенсивности спектров, что указывает на применимость такого типа мембран в качестве ГКР-активной поверхности для аптасенсоров. Для образцов с вирусами гриппа были получены микрофотографии РЭМ (рис. 4), на которых наблюдается сохранение структуры напыленной поверхности после фильтрации биологических объектов.

С применением СИПМ получены топографии профилей поверхности трековых мембран, функционализированных аптамером, после фильтрации вирусов. Поверхность мембраны представляет собой пористую структуру с развитым рельефом (рис. 5). Контрольный образец *а* (с вирусом NDV) имеет большую шероховатость по-

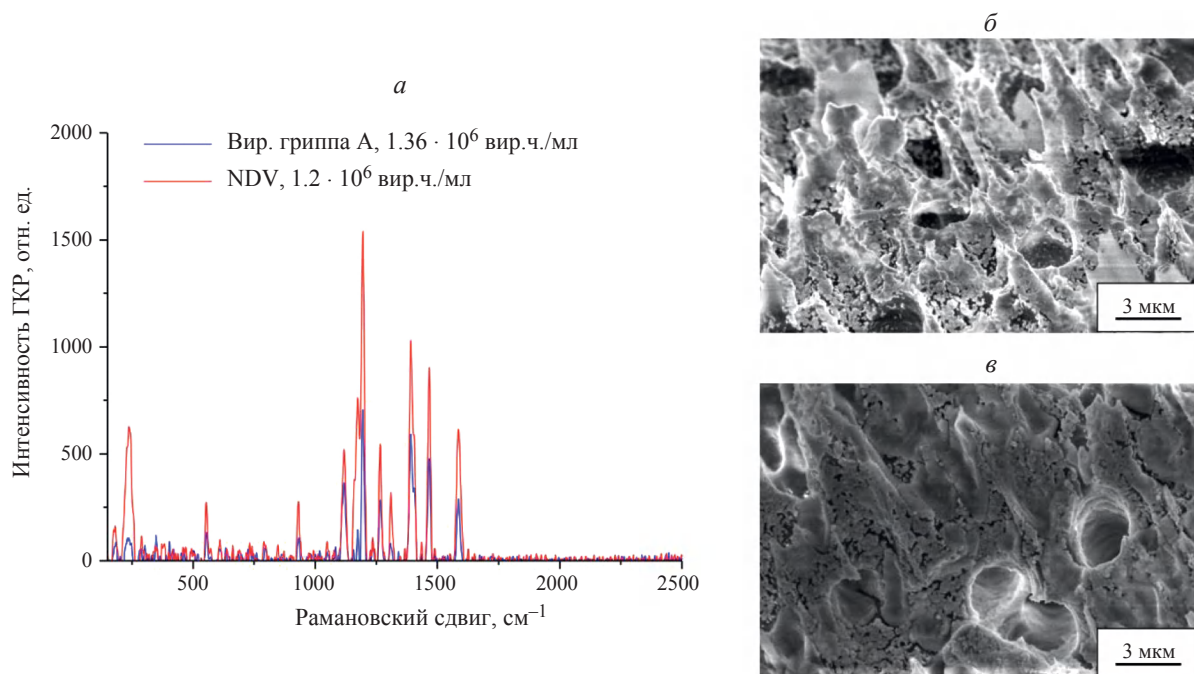
верхности, чем образец *б* с вирусом гриппа А, что может быть связано с адгезией вируса гриппа А на поверхности мембраны. Кроме того, образцы с вирусом гриппа А содержат сформированные структуры по размеру сопоставимые с размером вирусных частиц (около 100 нм), которые преимущественно расположены возле пор. Предположительно, это агрегаты из наночастиц серебра и вируса гриппа А.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

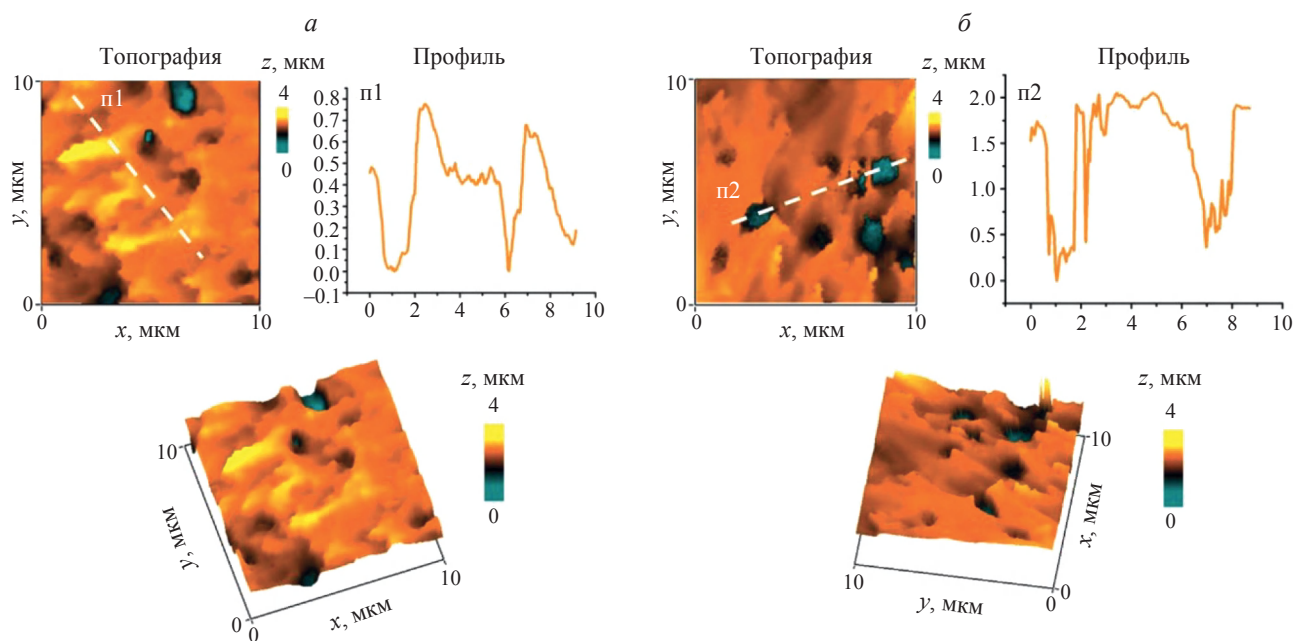
Таким образом, нами было показано, что магнетронный способ напыления металлов на полиэтилентерефталатные трековые мембраны с развитой поверхностью обеспечивает стабильную в биологических жидкостях ГКР-активную поверхность, обладающую относительно небольшим разбросом интенсивностей ГКР-спектров между разными образцами. Показано, что морфология мембраны не претерпевает изменений в результате функционализации аптамером и фильтрации биологических жидкостей. Полученные субстраты имеют потенциал применения в ГКР-биосенсорах на основе аптамеров, отличая целевой вирус (вирус гриппа А) от контрольного вируса (вирус NDV) по соотношению интенсивности ГКР-спектра к флуоресценции введенной в аптамер метки Су3.

Образцы вирусов были получены от А.С. Гамбарян (Федеральный научный центр исследова-





**Рис. 4.** Аптасенсор для определения вируса гриппа А с использованием мембраны, полученной магнетронным напылением. ГКР-спектры для образцов с целевым (вирус гриппа А) и нецелевым (NDV) аналитами (а). Микрофотографии РЭМ поверхности мембраны после проведения опыта с вирусом гриппа А (б).



**Рис. 5.** Аптасенсор для определения вируса гриппа А с использованием Топография и профиль поверхности: контрольных образцов (вирус NDV) (а) и образцов с вирусом гриппа А (б).



ний и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия). Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра прикладной физики ЛЯР ОИЯИ О.Л. Ореловичу и С.А. Митюхину за помощь в исследовании образцов трековых мембран, а также Д.В. Щеголеву и Р.К. Рагимовой за помощь в изготовлении опытных образцов трековых мембран.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-65-00015, <https://rscf.ru/project/24-65-00015>. Исследование морфологии поверхности образцов аптасенсоров была проведена в научно-исследовательской лаборатории “Фотонная сенсорика и плазмонные материалы” в Национальном исследовательском университете “МИЭТ” в рамках темы государственного задания FSMR-2024-0012.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ouyang L., Ren W., Zhu L., Irudayaraj J. // *Rev. Analyt. Chem.* 2017. V. 36. No. 1. Art. No. 20160027.
2. Zhdanov G., Zavyalova E., Gambaryan A. et al. // *Biosensors.* 2024. V. 14. No. 1. P. 20.
3. Ling X., Fang W., Lee Y.-H. et al. // *Nano Lett.* 2014. V. 14. No. 6. P. 3033.
4. Jun Yan, Xijiang Han, Jiaojiao He et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2012. V. 4. P. 2752.
5. Kukushkin V., Ambartsumyan O., Astrakhantseva A. et al. // *Nanomaterials.* 2022. V. 12. No. 21. P. 3854.
6. Mosier-Boss P.A. // *Nanomaterials.* 2017. V. 7. P. 142.
7. Nuntawong N., Horprathum M., Eiamchai P. et al. // *Vakuum.* 2010. V. 84. P. 1415.
8. Li Z., Huang X., Lu G. // *J. Mater. Chem. C.* 2020. V. 8. P. 3956.
9. Серебrenникова С.И., Кукушкин В.И., Криставчук О.В. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2022. Т. 86. № 4. С. 516; Serebrennikova S.I., Kukushkin V.I., Kristavchuk O.V. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* V. 86. No. 4. P. 423.
10. Kukushkin V., Kristavchuk O., Andreev E. et al. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023. V. 10. P. 2022.
11. Кукушкин В.И., Криставчук О.В., Жданов Г.А. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2023. Т. 87. № 2. С. 201; Kukushkin V.I., Kristavchuk O.V., Zhdanov G.A. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2023. V. 87. No. 2. P. 172.
12. Криставчук О.В., Сохацкий А.С., Козловский В.И. и др. // *Коллоид. журн.* 2021. Т. 83. № 4. С. 423; Kristavchuk O.V., Sohatsky A.S., Skoi V.V. et al. // *Colloid J.* 2021. V. 83. No. 4. P. 448.

## Development of SERS active track-etched membranes with high sustainability in biological fluids

D. S. Tikhonova<sup>a,\*</sup>, E. V. Andreev<sup>b</sup>, R. Sh. Alieva<sup>a</sup>, S. V. Dubkov<sup>c</sup>, V. S. Kolmogorov<sup>a,d</sup>,  
A. S. Erofeev<sup>d</sup>, A. N. Nechaev<sup>b</sup>, V. I. Kukushkin<sup>e</sup>, E. G. Zavyalova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, 141980 Russia

<sup>c</sup>National Research University of Electronic Technology, Moscow, 124498 Russia

<sup>d</sup>National Research University of Technology MISIS, Moscow, 119049 Russia <sup>e</sup>Osipyan Institute of Solid-State Physics of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

\*e-mail: [daria.tikhonova@chemistry.msu.ru](mailto:daria.tikhonova@chemistry.msu.ru)

Different approaches for creating an enhancing surface based on a track-etched polyethylene terephthalate membrane are studied. The stability of the covering and the potential for the usage of the obtained substrates were evaluated on the example of the aptasensor for the determination of the influenza A virus.

**Keywords:** surface enhanced Raman scattering, 3D substrates, track-etched membranes, sputtering, aptamers, influenza A virus, aptasensor.