

00

Хемилюминесценция функционализированной поверхности графена

© А.Ю. Плеханов^{1,2}, М.В. Пузык^{3¶}, А.С. Усиков^{4,5}, А.Д. Роенков⁶, А.А. Лебедев⁵, С.П. Лебедев⁷,
С.А. Клотченко⁷, А.В. Васин⁷, Ю.Н. Макаров⁴

¹ Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова НИЦ „Курчатовский институт“,
188300 Гатчина, Россия

² Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004 Санкт-Петербург, Россия

³ РГПУ имени А.И. Герцена,
191186 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Nitride Crystals Inc.,
9702 Richmond, USA

⁵ ФТИ имени А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

⁶ Группа Нитридные кристаллы,
194156 Санкт-Петербург, Россия

⁷ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251 Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: puzyk@mail.ru

Поступила в редакцию 28.04.2022 г.

В окончательной редакции 03.06.2022 г.

Принята к публикации 16.06.2022 г.

Для анализа модификации функционализированной поверхности графена белковыми молекулами предложен хемилюминесцентный иммуноферментный метод. На примере очистки функционализированного графена показаны возможности хемилюминесцентного контроля состояния его поверхности. Обсуждены способы очистки функционализированного графена от белковых молекул с восстановлением способности вновь сорбировать белковые молекулы. Показано, что поверхность функционализированного графена может быть отмыта от сорбированных белков, и на основе такого очищенного графена может быть снова сконструирован биосенсор, в том числе с иной специфичностью. Поэтому графеновый сенсор может быть использован многократно.

Ключевые слова: функционализированный графен, 1-пиренметиламин солянокислый, циклическая вольт-амперометрия, хемилюминесценция, моноклональные антитела, биосенсоры.

DOI: 10.21883/OS.2022.09.53305.3628-22

Введение

В настоящее время актуальным направлением является разработка и совершенствование методов получения и исследования графена, одного из широко изучаемых углеродных материалов. Развитая поверхность толщиной в один атом, химическая и механическая стойкость, высокая электро- и теплопроводность, способность легкой функционализации поверхности различными молекулами, хорошая биосовместимость графеновых материалов — всё это привлекает специалистов из различных областей науки и техники. Диапазон исследования графеновых материалов очень широк: суперконденсаторы [1,2], системы утилизации CO₂ [3], очистки воды [4], катализ [5,6], наноносители для доставки лекарственных средств [7], сенсоры [8–12].

Электропроводность графена в значительной мере изменяется при присоединении к его поверхности других молекул. На этом принципе основано действие графеновых сенсоров. Однако сама по себе графеновая пленка не является избирательно чувствительным сен-

сором, поскольку легко сорбирует на своей поверхности разнообразные молекулы. При создании биосенсора с целью повышения avidности и селективности графена в отношении белковых молекул его поверхность функционализируют активными аминогруппами [13,14], на которых затем заякориваются белковые молекулы (антигены и антитела). Антитела, закреплённые на поверхности графена, могут быть выявлены, в частности, вторичным антителом, меченым квантовой точкой, с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии [15].

Присоединение к поверхности графена биологически активных молекул, например антигенов или антител, позволяет создавать биосенсоры, способные селективно выявлять биологические молекулы в различных средах, что может быть применимо в медицинской диагностике. Заметим, что взаимодействие антитело-антиген имеет фундаментальное значение для функционирования иммунной системы человека [16]. Эта реакция специфического связывания антигенов с соответствующими им антителами приводит к образованию иммунного комплекса. Другими словами, взаимодействие антитело-

антиген осуществляется по принципу ключ-замок (key-lock) трехмерной пространственной комплементарности внешних электронных облаков антитела и молекул антигена. *In vitro* эти реакции лежат в основе многих иммунологических методов и широко используются в лабораторной практике.

Наши исследования графеновых биосенсоров основаны на универсальной концепции контролируемого взаимодействия антитела со специфическим белком антигеном на поверхности графена, выращенном на SiC-подложках. В реакции взаимодействия принимают участие только комплементарные антитела и антигены, что обеспечивает селективность и высокую чувствительность биосенсора.

В наших экспериментах по сорбции флуоресцеина и моноклональных антител на функционализированном графене (ФГ) изменение электропроводности регистрировалось при концентрации тестовых молекул $1 \cdot (10^{-3} - 10^4)$ ng/ml [17]. Проводились отдельные эксперименты по определению групповых и других антигенов крови [11,14,18]. Также исследовались сенсоры по детектированию вирусов гриппа А и В при их концентрации ~ 100 pg/ml за время менее 1 min [19]. Проведенные исследования показали необходимость многократного использования одних и тех же графеновых сенсоров (чипов) для оптимизации режимов обработки поверхности графена и детектирования.

В данной работе мы описываем применение хемилюминесцентного метода для обнаружения белковых молекул на поверхности ФГ и контроля очистки поверхности графена после биохимических исследований. В качестве исходных образцов использовались пленки графена, выращенные на SiC-подложках.

Экспериментальная часть

Для создания биосенсоров мы получали графен методом сублимации поверхности полужолирующих подложек SiC (0001) $\pm 0.25^\circ$ размером 11×11 mm [12]. Процесс выращивания графена проводили в графитовом тигле, индуктивно нагреваемом высокочастотным генератором в атмосфере аргона (720–750 Torr) при температуре $\sim 1750^\circ\text{C}$. Присутствие монослоя графена на подложке SiC подтверждали по спектрам комбинационного рассеяния света [20]. Размер области графена, находящегося в контакте с раствором в описываемых экспериментах, был около 5×5 mm.

Качество поверхности полученной графеновой пленки оценивали методом циклической вольтамперометрии. Электрохимические исследования проводили на потенциостате-гальваностате ПИ-50-*Pro*, (Elins, Санкт-Петербург, Россия) в трехэлектродной ячейке в растворе 96 wt.% этанола (концентрация фонового электролита — 0.1 mol/l NH_4BF_4) при комнатной температуре. Рабочим электродом был графен/SiC-чип, электрод сравнения —

насыщенный хлоридсеребряный электрод и вспомогательный электрод — платиновая пластина. 96 wt.% этанол, содержащий 4 wt.% воды, выбран в качестве электролита для того, чтобы при проведении исследований можно было наблюдать поведение графенового материала в области окисления и восстановления воды.

Все дальнейшие операции, если не указано иначе, проводили при комнатной температуре.

Три отобранных графен/SiC-чипа размером 5×5 mm с хорошим качеством поверхности функционализировали аминогруппами способом, основанным на сорбции из раствора производных пирена [21]. Функционализацию графен/SiC-чипа осуществляли, помещая чип в 1 wt.% водный раствор солянокислого 1-пиренметиламина на 20 min. Далее чип промывали проточной водопроводной водой (1 min).

В качестве тестовых белковых молекул использовали моноклональные антитела против нуклеопротеина вируса гриппа А (клон 4Н1 производства НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Министерства здравоохранения РФ, С-Петербург далее „первичные антитела“). Имобилизацию (сорбцию) антител на графене проводили по следующей методике. Графеновые чипы выдерживали в растворе антител с концентрацией 250 $\mu\text{g/ml}$ в физиологическом фосфатно-буферном растворе (ФБР) в течение 60 min с последующим промыванием проточной водопроводной водой (0.5 min), затем еще раз однократно — в ФБР (5 min). Избыточную сорбционную ёмкость ФГ исчерпывали вымачиванием в ультрапастеризованном молоке жирностью 1.5 wt.% („Молочный комбинат „Петмол“, Санкт-Петербург) (20 min) [22].

Далее графеновые чипы выдерживали в растворе козьих антител против иммуноглобулинов G мыши, меченых пероксидазой хрена (далее „вторичные меченые антитела“) (BioRad, 1:3000, 20 min) с последующей промывкой проточной водопроводной водой (30 s), затем однократно — в ФБР (5 min).

Пероксидазную метку на подготовленной таким образом поверхности графена выявляли при помощи раствора, содержащего люминол, усилитель хемилюминесценции и перекись водорода (BioRad ECL). Для этого каплю (10 μl) раствора наносили на графеновый чип. Хемилюминесценцию выявляли прибором Chemidoc (BioRad). В качестве свидетеля (хемилюминесцирующей метки) использовали нитроцеллюлозную мембрану размером $\sim 1 \times 1$ cm.

Десорбцию белков с графена (далее отмывку, или очистку графена) проводили тремя способами:

- 1) отмывка поверхностно-активным веществом, в качестве которого использовали додецилсульфат натрия (1 wt.%), растворённый в трис-глициновом буфере (25 mmol/l трис — 250 mmol/l глицин, pH 8.3) при 50°C в течение 30 min;

- 2) отмывка водным раствором щелочи: 1 mol/l NaOH;

- 3) ферментативное разрушение белков. В качестве протеолитического фермента использовали субтилизин (протеолитические таблетки для контактных линз Avizor

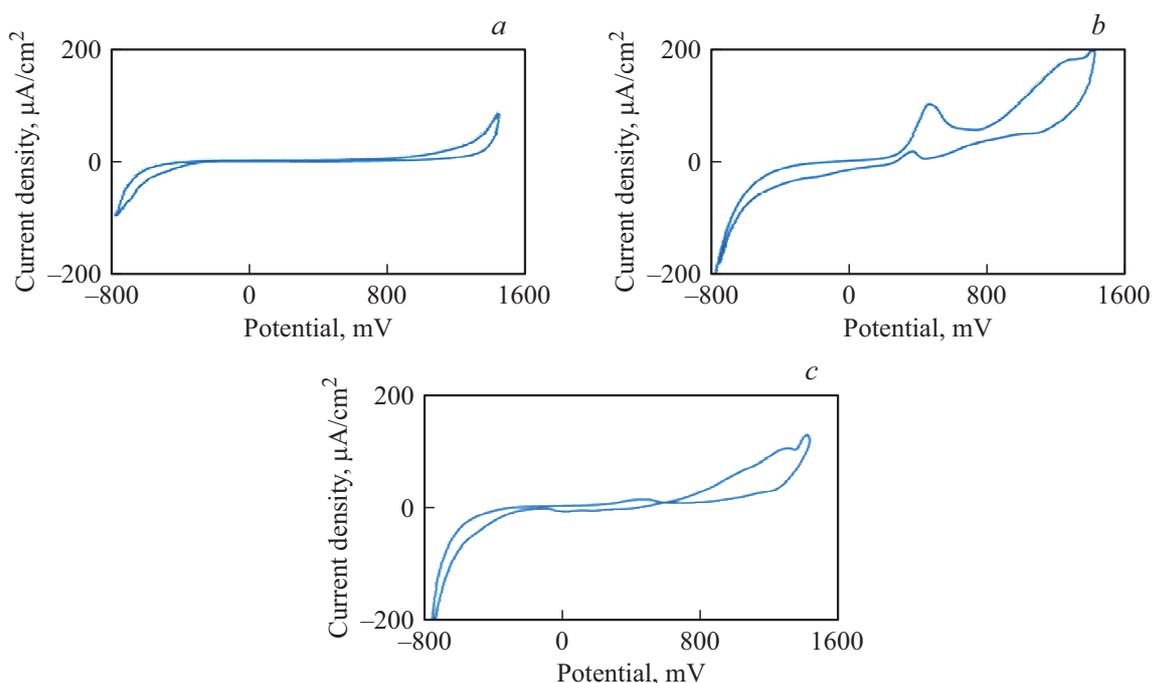


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы графен/SiC-электродов; скорость развертки потенциала 50 мВ/с. Значения потенциалов приведены по отношению к хлоридсеребряному электроду. *a* — качественный графен *b, c* — некачественный графен.

в рекомендуемой производителем концентрации 1 таблетка на 5 ml раствора ФБР). Графеновые чипы с иммобилизованными белками помещали в раствор субтилизина на 15 min при комнатной температуре и далее на 15 min при 50°C.

После выдержки в указанных растворах отмытые графеновые чипы ополаскивали 0.5 min в проточной водопроводной воде и выдерживали в ФБР 5 min с последующим проявлением остаточной пероксидазной активности, как описано выше.

Отмытую поверхность графена проверяли на наличие способности к связыванию белковых молекул. В качестве тестовой молекулы теперь использовали вторичные меченые антитела. Графеновые чипы выдерживали в растворе вторичных меченых антител (1 : 3000 на ФБР) в течение 60 min с последующим промыванием проточной водопроводной водой (0.5 min), затем однократно в ФБР (5 min). Пероксидазную метку на подготовленной таким образом поверхности графена выявляли, как описано выше.

Определение спектра и динамики гашения хемилюминесценции люминола проводили в экстемпорально приготовленном растворе, содержащем 0.012 wt.% люминола, 0.005 wt.% п-кумаровой кислоты, 5 wt.% диметилсульфоксида и 0.003 wt.% H₂O₂ на 0.1 mol/l трис-HCl (pH 8.8). Для определения спектра хемилюминесценции в растворе в 1 ml указанного раствора непосредственно перед измерением вносили 1 μl 1 wt.% водного раствора пероксидазы хрена (Sigma). Для определения спектра хемилюминесценции на твердой поверхности 1 μl 1 wt.% раствора пероксидазы наносили на нитроцеллюлозную

мембрану размером ~ 1 × 1 см, на которую затем непосредственно перед измерением наносили 50 μl указанного проявляющего раствора. Измерения проводили при помощи спектрофлуориметра „Флюорат-02-Панорама“ (ГК Люмэкс (Lumex), Санкт-Петербург).

Результаты и обсуждение

Графен по своей природе близок графиту, т. е. состоит из *sp*²-гибризованного углерода, соединенного в двумерную гексагональную решетку [23], а поэтому должен иметь широкую область идеальной поляризуемости. На рис. 1 показаны типичные циклические вольтамперограммы (ЦВАГ) графен/SiC-чипов в фоновом электролите для трех образцов. В области потенциалов меньше -100 mV и больше +1100 mV наблюдаются процессы восстановления и окисления воды соответственно. Уменьшение ширины области поляризуемости и присутствие на ЦВАГ дополнительных пиков в данной области потенциалов (рис. 1, *b, c*) указывает на недостатки, связанные либо с самим графеном, либо с изготовлением графен/SiC-чипов: некачественная графеновая пленка в чипе. Поэтому для дальнейшего эксперимента отбирали графен/SiC-чипы, имеющие широкую область идеальной поляризации (~ 1200 mV) (рис. 1, *a*).

Отобранные образцы графена далее были функционализированы и инкубированы в растворе тестовых белковых молекул. Однако в наших экспериментах мы столкнулись со значительными затруднениями в попытках выявить и охарактеризовать функционализацию

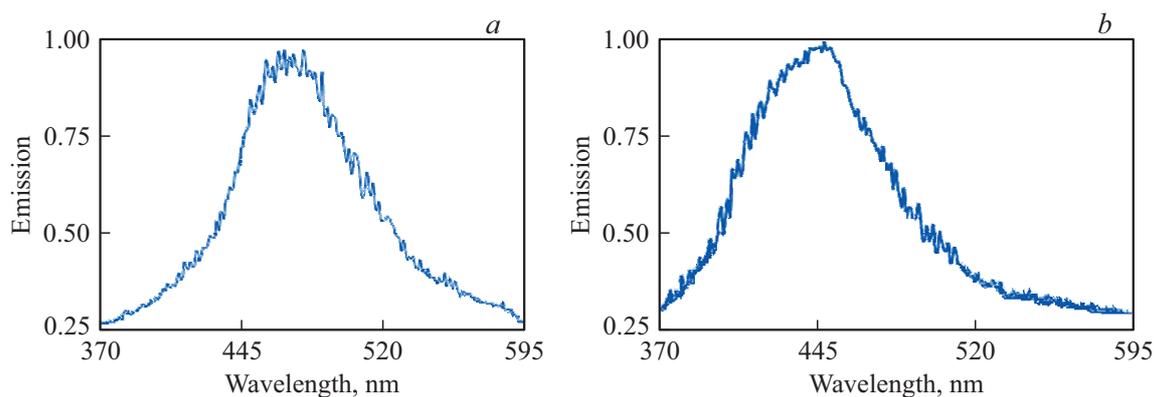


Рис. 2. Спектры хемиллюминесценции люминола в растворе (а) и на нитроцеллюлозе (b).

графена и/или сорбцию белковых молекул методом электронной микроскопии (сканирующий электронный микроскоп Tescan MIRA-3). Для разрешения возникшего затруднения мы разработали хемиллюминесцентный иммуноферментный метод выявления белковых молекул на поверхности графена.

Спектр хемиллюминесценции люминола в растворе представлен на рис. 2, а. Спектр хемиллюминесценции люминола, катализируемой пероксидазой хрена, иммобилизованной на твёрдой подложке ($1 \mu\text{g}$ пероксидазы хрена нанесён на нитроцеллюлозную мембрану размером $1 \times 1 \text{ cm}$ в $1 \mu\text{l}$ воды, проявление $10 \mu\text{l}$ раствора BioRad ECL) представлен на рис. 2, b. Заметно некоторое гипсохромное смещение спектра хемиллюминесценции в случае иммобилизованного фермента на нитроцеллюлозе по сравнению с ферментом, находящимся в растворе, обусловленное, по-видимому, явлением сольватохромизма.

Сочетание низкой концентрации пероксидазы на поверхности ФГ и невысокой чувствительности спектрофлуориметра не позволили зафиксировать спектры хемиллюминесценции на поверхности графена. Поэтому эксперименты по хемиллюминесценции ФГ проводили с использованием более чувствительного прибора ChemiDoc (BioRad). Чувствительность последнего позволила также использовать пероксидазу в значительно меньшей концентрации. В частности, мы использовали вторичные меченые антитела в разведении, характерном для рутинных иммунохимических исследований. Результаты экспериментов по хемиллюминесценции на поверхности графена приведены на рис. 3.

Из рис. 3 следует, что при помощи современных способов оптической регистрации хемиллюминесценции иммуноферментный анализ (ИФА) применим как метод анализа функционализации графена. Действительно, в нашем случае ИФА позволяет распознать ФГ с первичными антителами (рис. 3, b, 1, 2). Причём с высокой специфичностью: на рис. 3, b хемиллюминесценция третьего графенового чипа (3) не регистрируется (поскольку первичных антител на образец рис. 3, b, 3 не нанесено,

а белки, сорбированные из молока, делают поверхность ФГ уже недоступной для вторичных меченых антител).

Поверхность ФГ представляет собою ароматическую (гидрофобную) матрицу, в нашем случае содержащую аминокислоты. Эти структуры могут вступать с белковыми молекулами во взаимодействие различного рода. Так, между аминокислотными группами ФГ и карбоксильными группами Глутамин и Аспаргин в составе белка могут возникать ионные взаимодействия; те же аминокислотные группы ФГ могут образовывать водородные связи с гидроксильными группами Серин, Треонин, Тирозин в составе белковой молекулы. Кроме того, ароматические группы Фенил, Тирозин, Триптофан и развитые алифатические группы Вал, Лейцин и Иле могут вступать в гидрофобные взаимодействия с ароматической поверхностью графена.

Таким образом, для очистки (отмывки) ФГ от иммобилизованных на нём белковых молекул могут быть предложены три способа:

- 1) очистка ионным поверхностно-активным веществом: 1 wt.% раствором додецилсульфата натрия (ДДС-Na), разрушающим гидрофобные взаимодействия;
- 2) очистка щёлочью, в частности, 1 mol/l NaOH. При этом происходит разрушение ионных связей; кроме того, в сильнощелочных условиях повышается растворимость белков и происходит частичный их гидролиз;
- 3) ферментативное разрушение белков протеолитическими ферментами, такими как трипсин и субтилизин.

На рис. 3, c видно, что после отмывки тремя способами ни на одном из графеновых чипов хемиллюминесценции не происходит. Строго говоря, из рис. 3, c следует только, что на чипах 1 и 2 повреждена пероксидаза. Если графен действительно очищен от белковых молекул, он восстановит белок-связывающую активность. В частности, он снова сможет сорбировать пероксидазную метку.

Действительно, на рис. 3, d видно, что после обработки 1 wt.% ДДС-Na, 1 mol/l NaOH и субтилизинном ФГ снова способен сорбировать вторичные меченые антитела, что видно по хемиллюминесценции. Заметим, что третий образец ФГ (рис. 3, d, 3) после очистки также восстановил сорбционную способность (сравним

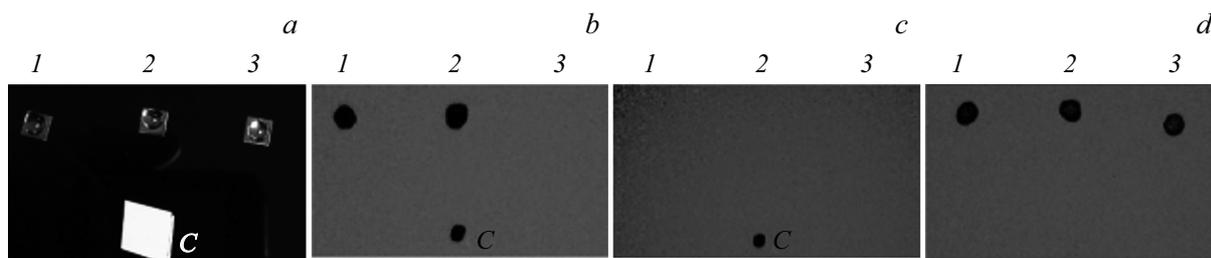


Рис. 3. Фотографии эксперимента по хемилюминесценции поверхности ФГ. Цифры сверху 1, 2, 3 — графеновые чипы, под ними находится С — свидетель с $1\mu\text{l}$ вторичных меченых антител на нитроцеллюлозной мембране), на рис. 3, d свидетеля не было. (a) Фотография в видимом свете графеновых чипов с нанесёнными каплями проявляющего раствора и свидетеля. (b) Хемилюминесценция. 1, 2 — чипы инкубированы в первичных антителах, затем в молоке, затем во вторичных меченых антителах; 3 — чип инкубирован в молоке, затем во вторичных меченых антителах. (c) Хемилюминесценция. 1 — отмывка 1 wt.% ДДС-Na; 2 — отмывка 1 mol/l NaOH; 3 — отмывка субтилизином. (d) Хемилюминесценция. Все чипы после отмывки инкубированы во вторичных меченых антителах.

хемилюминесценцию рис. 3, d и рис. 3, b, 3), поскольку с него были отмыты белки молока.

Заключение

В настоящей работе мы наблюдали хемилюминесценцию на поверхности ФГ. Мы показали, что хемилюминесцентный иммуноферментный анализ поверхности ФГ при конструировании биосенсора является полезной альтернативой электронной микроскопии. В частности, простота проведения иммуноферментного анализа позволяет легко подбирать условия для связывания антител с ФГ при создании биосенсоров. Отметим, что вторичные меченые антитела, способные катализировать хемилюминесценцию, и раньше применялись в биосенсорах [19], но лишь для усиления электрического отклика.

Мы также предложили три способа очистки ФГ от белковых молекул с восстановлением способности ФГ сорбировать белковые молекулы. Это наблюдение имеет конкретный практический выход, а именно открывает возможность многократного использования графеновых биосенсоров. В самом деле, рабочий элемент отработанного биосенсора представляет собою поверхность ФГ, загрязнённую белками (антителами и антигенами, иногда вторичными антителами и балластными белками, такими как сывороточный альбумин или белки молока). Как мы здесь показали, поверхность ФГ может быть отмыта от этих белков. И на основе такого очищенного графена может быть снова сконструирован биосенсор, в том числе с иной специфичностью. Учитывая многостадийность производства (включая, например, напыление золотых контактов) и значительную трудоёмкость изготовления графеновых биосенсоров, возможность многократного их использования способствует быстрой оптимизации режимов обработки поверхности графена и детектирования.

Финансирование работы

Работа частично профинансирована Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы стратегического академического лидерства „Приоритет-2030“ (Соглашение 075-15-2021-1333 от 30.09.2021), а также в рамках проекта РНФ 22-12-00134.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] X. Fan, B.D. Phebus, L. Li, S. Chen. *Sci. Adv. Mat.*, **7**, 1916 (2015). DOI: 10.1039/C000417K
- [2] L.Q. Xu, Y.L. Liu, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, G.D. Fu. *Macromol. Rapid Commun.*, **32**, 684 (2011). DOI: 10.1002/marc.201000765
- [3] M.-Q. Yang, Yi-J. Xu. *Nanoscale Horizons*, **1**, 185 (2016). DOI: 10.1039/C5NH00113G
- [4] R. Sharma, P. Saini. *Diamond and Carbon Composites and Nanocomposites*, **2**, 21 (2016). DOI: 10.5772/63666
- [5] N. Zhang, M.Q. Yang, S. Liu, Y. Sun, Y.J. Xu. *Chem. Rev.*, **115**, 10307 (2015). DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00267
- [6] M.Q. Yang, Y.J. Xu. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 19102 (2013). DOI: 10.1039/c3cp53325e
- [7] J. Liu, L. Cui, D. Losic. *Acta Biomater.*, **9**, 9243 (2013). DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.016
- [8] L.Q. Xu, Y.L. Liu, K.G. Neoh, E.T. Kang, G.D. Fu. *Macromol. Rapid Commun.*, **32**, 684 (2011). DOI: 10.1002/marc.201000765
- [9] A.D. Smith, K. Elgammal, F. Niklaus, A. Delin, A.C. Fischer, S. Vaziri, F. Forsberg, M. Räsander, H. Hugosson, L. Bergqvist, S. Schröder, S. Kataria, M. Östlinga, M.C. Lemme. *Nanoscale*, **7**, 19099 (2015). DOI: 10.1039/C5NR06038A
- [10] А.А. Лебедев, В.Ю. Давыдов, С.Н. Новиков, Д.П. Литвин, Ю.Н. Макаров, В.Б. Климович, М.П. Самойлович. *Письма в ЖТФ*, **14**, 28 (2016). [А.А. Lebedev, V.Y. Davydov, C.N. Novikov, D.P. Litvin, Y.N. Makarov, V.B. Klimovich,

- M.P. Samoilovich. *Technical Physics Letters*, **42** (7), 729 (2016). DOI: 10.1134/S1063785016070233].
- [11] S. Lebedev, A. Usikov, S. Novikov, E. Shabunina, N. Schmidt, I. Barash, A. Roenkov, A. Lebedev, Y. Makarov. *Materials Science Forum*, **924**, 909 (2018). DOI: 10.4028/www.scientific.net/MSF.924.909
- [12] А.А. Лебедев, С.П. Лебедев, С.Н. Новиков, В.Ю. Давыдов, А.Н. Смирнов, Д.П. Литвин, Ю.Н. Макаров, В.С. Левицкий. *ЖТФ*, **86** (3), 135 (2016). [A.A. Lebedev, S.P. Lebedev, S.N. Novikov, V.Y. Davydov, A.N. Smirnov, D.P. Litvin, Y.N. Makarov, V.S. Levitskii. *Technical Physics*, **61** (3), 453 (2016). DOI: 10.1134/S1063784216030130].
- [13] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim. *Chem. Rev.*, **112**, 6156 (2012). DOI: 10.1021/cr3000412
- [14] A. Usikov, K. Borodkin, S. Novikov, A. Roenkov, A. Goryachkin, M. Puzyk, I. Barash, S. Lebedev, A. Zubov, Y. Makarov, A. Lebedev. *Proc. Estonian Acad. Sci.*, **68**, 207 (2019). DOI: 10.3176/proc.2019.2.13
- [15] Z. Tehrani, G. Burwell, M.A. Mohd Azmi, A. Castaing, R. Rickman, J. Almarashi, P. Dunstan, A. Miran Beigi, S. H. Doak, O.J. Guy. *2D Mater.* **1**, 025004 (2014). DOI: 10.1088/2053-1583/1/2/025004
- [16] R. D. Davies, E.A. Padlan, S. Sheriff. *Annual Review of Biochemistry*, **59**, 439 (1990). DOI: 10.1146/annurev.biochem.59.1.439
- [17] А.С. Усиков, С.П. Лебедев, А.Д. Роенков, И.С. Бараш, С.В. Новиков, М.В. Пузык, А.В. Зубов, Ю.Н. Макаров, А.А. Лебедев. *Письма в ЖТФ*, **46** (10), 3 (2020). DOI: 10.21883/PJTF.2020.10.49421.18250
- [18] A. Usikov, M. Puzyk, S. Novikov, I. Barash, O. Medvedev, A. Roenkov, A. Goryachkin, S.P. Lebedev, A. Zubov, Y. Makarov, A.A. Lebedev. *Key Engineering Materials*, **799**, 197 (2019). DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.799.197
- [19] А.А. Лебедев, С.Ю. Давыдов, И.А. Елисейев, А.Д. Роенков, О. Авдеев, С.П. Лебедев, Ю. Макаров, М. Пузык, С. Клотченко, А.С. Усиков. *Materials*, **14**, 590 (2021). DOI: 10.3390/ma14030590
- [20] В.Ю. Давыдов, Д.Ю. Усачёв, С.П. Лебедев, А.Н. Смирнов, В.С. Левицкий, И.А. Елисейев, П.А. Алексеев, М.С. Дунаевский, О.С. Вилков, А.Г. Рыбкин, А.А. Лебедев. *ФТП*, **51** (8), 1116 (2017). [V.Y. Davydov, D.Y. Usachov, S.P. Lebedev, A.N. Smirnov, V.S. Levitskii, I.A. Eliseyev, P.A. Alekseev, M.C. Dunaevskiy, O.Y. Vilkov, A.G. Rybkin, A.A. Lebedev. *Semiconductors*, **51** (8), 1072 (2017). DOI: 10.21883/FTP.2017.08.44800.8559].
- [21] R.M. Torrente-Rodríguez, H. Lukas, J. Tu, J. Min, Y. Yang, C. Xu, H.B. Rossiter, W. Gao. *Matter.*, **3** (6), 1981 (2020). DOI: 10.1016/j.matt.2020.09.027
- [22] A.Y. Plekhanov. *Analytical Biochemistry*, **239** (1), 110 (1996). DOI: 10.1006/abio.1996.0298
- [23] F. Schedin, A.K. Geim, S.V. Morozov, E.W. Hill, P. Blake, M.I. Katsnelson, K.S. Novoselov. *Nature Mater.*, **6**, 652 (2007). DOI: 10.1038/nmat1967