

Biologische modificatie en karakterisatie van grafeen-gebaseerde oppervlakken voor biosensor toepassingen

Jef Ryken

promotor :
Prof. dr. Patrick WAGNER

co-promotor :
Prof. dr. Thomas CLEIJ

Voorwoord

Ik weet nog de dag dat ik mijn eerste les op Universiteit Hasselt kreeg. Voor ik het wist moest ik al een masteronderwerp zoeken. En nu is dit ook bijna ten einde. De masterstage is zo goed als afgelopen en de thesis is geschreven. Dit was allemaal niet gelukt zonder de hulp en steun van vele mensen.

Zo zou ik graag Rob Vansweevelt bedanken voor de goede begeleiding en de mogelijkheid om mee te helpen aan zijn doctoraatsonderzoek. Ook Prof. dr. Wagner en Prof. dr. Thomas Cleij voor de goede begeleiding doorheen de twee masterjaren.

Ook mijn familie wil ik bedanken. In het bijzonder mijn ouders en mijn broer. Daarbij komen mijn grootvader, Jos Willems, en mijn nonkel, Wilfried Willems, voor het nalezen van mijn thesis.

Een belangrijk deel van verder studeren is het op kot gaan. Daarom zou ik graag mijn kotgenoten bedanken voor de toffe jaren op Kot Paul Paulemans.

We hebben elkaar het laatste jaar niet veel gezien maar toch zou ik graag mijn klasgenoten bedanken voor de sfeer in de klas gedurende deze twee jaren. In het bijzonder Martijn Leekens, Pieter Robaeyns en Jan Bex die samen met mij hun stage deden op het IMO. Ze hebben me met raad en daad bijgestaan tijdens deze stage, ze hebben ervoor gezorgd dat er steeds wel een plezant onderwerp was om over te discussiëren of om mee te lachen. Bedankt mannen!

Inhoudsopgave

Lijst van Afkortingen	i
Abstract	ii
1. Inleiding	1
1.1 Biosensoren	1
1.1.1 Biologische component	2
1.1.2 Transducer	2
1.1.3 Uitlezing	2
1.1.4 Voorbeelden van commercieel verkrijgbare biosensoren	3
1.2 Grafeen en Carbon Nanowalls	3
1.3 DNA-eigenschappen en binding	5
1.4 De aanhechting van 1-Pyrenedecanoic Acid aan grafeen	6
1.5 Analysetechnieken	7
1.5.1 Technieken op basis van fluorescentie	7
<i>Fluorescentiemicroscopie</i>	7
<i>Fluorescentiespectroscopie</i>	8
1.5.2 Contacthoekmetingen	9
1.6 Doelstellingen	10
2. Materiaal en methoden	11
2.1 Silicium substraten	11
2.2 Reinigen van silicium substraten	11
2.3 Aanhechting van grafeen	11
2.4 Aanhechting van PDA	12
2.5 Vetzuraanhechting	13
2.6 Aanhechting van DNA	14
2.7 DNA-hybridisatie	15
2.8 DNA-denaturatie	16
2.9 Fluorescentiemicroscopie	17
2.10 Contacthoekmetingen	17
2.11 Fluorescentiespectroscopie	18

2.12	Verwerking met ImageJ.....	18
3.	Resultaten en Discussie.....	20
3.1	Ultrasoneringsexperimenten met Chloroform en Isopropanol	20
3.2	Effect van vetzuur- en DNA-aanhechting op de contacthoek	24
3.3	Invloed van incubatietijd van de EDC-reactie en vergelijking van EDC-negatieve en EDC-positieve stalen	28
3.4	Hybridisatie- en denaturatie-experimenten met verschillen in temperatuur en vergelijking tussen EDC-negatieve en EDC-positieve stalen	31
	<i>Bijkomende experimenten met 1 MM DNA</i>	<i>36</i>
3.5	Aanhechting van PDA aan flakes	36
4	Conclusies en synthese.....	41
5	Referenties.....	43

Lijst van Afkortingen

1MM	1 mismatch
10-UDA	10-undecenoic acid
Alexa 488	Alexa Fluor® 488
CHCl ₃	Chloroform
CNWs	Carbon Nanowalls
DMF	Dimethylformamide
DNA	Deoxyribonucleïnezuur
dsDNA	dubbelstrengig DNA
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
HCG	Humaan ChorionGonadotrofine
HOPG	Highly Oriented Pyrolytic Graphite
IPA	Isopropanol
MeOH	Methanol
MES-buffer	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer
MW PECVD	MicroWave Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	Polydimethylsiloxaan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfaat
Si	Silicium
SiO ₂	Siliciumdioxide
SSC	Saline-Sodium Citrate
ssDNA	enkelstrengig DNA
US	Ultrasoon
UV	Ultraviolet

Abstract

Het gebruik van biosensoren is de laatste jaren sterk toegenomen. Biosensoren worden in tal van sectoren gebruikt voor het opsporen van antilichamen, pesticiden, enzymen, etc. Ook DNA is een veelvoorkomende biologische component die door middel van biosensoren kan opgespoord worden. Als basis van deze biosensoren worden tal van oppervlakken gebruikt waarop de detectiemoleculen worden gehecht. Elk oppervlak heeft zijn specifieke eigenschappen met voor- en nadelen. Grafeen is een oppervlak dat enkel bestaat uit koolstofatomen. Dit heeft als gevolg dat grafeen belangrijke karakteristieken bezit wat betreft elektrische eigenschappen. Door deze elektrische eigenschappen is het relevant dat onderzoek wordt gedaan naar het gebruik van een grafeen-gebaseerd oppervlak voor de ontwikkeling van snelle en gevoelige sensoren. De vraag is echter of DNA voldoende hecht aan een grafeen-gebaseerd oppervlak om een specifieke en reproduceerbare detectie van het doel-DNA mogelijk te maken.

De modificatie van diamant met DNA is mogelijk door gebruik te maken van het EDC-protocol, maar is dit ook zo voor grafeen als oppervlak? Hiervoor worden experimenten gedaan met EDC-negatieve en EDC-positieve stalen waaruit blijkt dat EDC een goede crosslinker is voor de aanhechting van DNA aan grafeenachtige structuren. Om de reproduceerbaarheid van de sensor te bepalen worden hybridisatie- en denaturatietesten gedaan met complementair DNA. Uit deze testen blijkt dat de sensor herbruikbaar is na een denaturatiestap.

Een nieuwe benadering voor de aanhechting van DNA aan grafeen is het gebruik van PDA. Hier is echter verder onderzoek nodig.

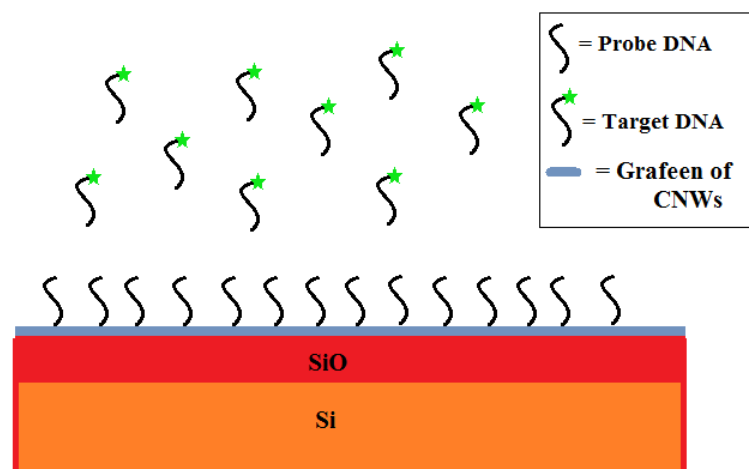
Uit deze thesis kan besloten worden dat grafeen een goed oppervlak is voor het maken van een DNA-gebaseerde biosensor maar voor de optimalisatie van de technieken is verder onderzoek nodig. Grafeen opent nieuwe perspectieven voor het maken van sensoren waarbij de detectie gebaseerd is op elektrische metingen.

1. Inleiding

Biomedisch onderzoek is in de loop der jaren steeds belangrijker geworden. Zo is ook het gebruik van - en onderzoek naar - biosensoren sterk toegenomen. Dit komt doordat biosensoren de mogelijkheid bieden om op een eenvoudige manier een molecule op te sporen waardoor ze in tal van sectoren worden gebruikt zoals de landbouw, de voedingssector en de medische sector (1)(2). In deze thesis wordt onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van een DNA-gebaseerde biosensor met grafeen als bindingsoppervlak.

1.1 Biosensoren

Een biosensor (Figuur 1) is een sensor die een analiet kwantitatief kan detecteren door gebruik te maken van een biologisch element of een sensor die een biologisch molecule kan detecteren. De aanwezigheid van het analiet wordt zichtbaar gemaakt door middel van een fysicochemische component zodat een fysische of chemische reactie optreedt. Een andere benaming van de fysicochemische component is de uitlezing. Een biosensor bestaat uit drie componenten: het gevoelige biologische herkenningselement, de transducer en de uitlezing (1).



Figuur 1: De opstelling van de biosensor die gebruikt wordt tijdens deze masterstage

1.1.1 Biologische component

Dit is het deel van de biosensor dat instaat voor de herkenning van het doelmolecule. De gevoelige biologische component kan verschillende vormen aannemen zoals antilichamen, enzymen, micro-organismen, etc. (1) In dit geval wordt gebruik gemaakt van een stukje enkelstrengig *probe* DNA. Het molecule dat herkend wordt is enkelstrengig DNA dat fluorescent gelabeld is met Alexa 488. Er wordt gebruik gemaakt van gelabeld complementair DNA.

1.1.2 Transducer

De transducer of het detectie-element zet de herkenning van het doelmolecule om in een ander uitleesbaar signaal. Dit signaal kan optisch, elektrisch, piëzo-elektrisch, elektrochemisch, etc. zijn. Een belangrijke eigenschap is dat het makkelijker kan worden gemeten en gekwantificeerd dan het herkenningssignaal (1). Tijdens deze stage heeft het grafeenachtig oppervlak de functie van transducer. Dit grafeen wordt aangebracht op een substraat wat in dit geval silicium (Si) is. Het onderzoek bestaat er deels uit om grafeen aan te brengen op Si-substraten, en deels om het *probe* DNA te binden aan dit grafeen. Een ander oppervlak dat tijdens dit onderzoek gebruikt wordt is een Si-substraat dat bedekt is met *Carbon Nanowalls* waarop het DNA wordt gebonden.

1.1.3 Uitlezing

Dit beschrijft de manier waarop de detectie gebeurt. Zoals eerder vermeld kan dit op verschillende manieren (1). Tijdens deze thesis wordt vooral gebruik gemaakt van de optische manier. Het te herkennen DNA is fluorescent gelabeld waardoor een fluorescentiemicroscop kan gebruikt worden voor de detectie van het DNA. In de toekomst is het de bedoeling dat de detectie elektrisch wordt gedaan maar hiervoor is verder onderzoek nodig.

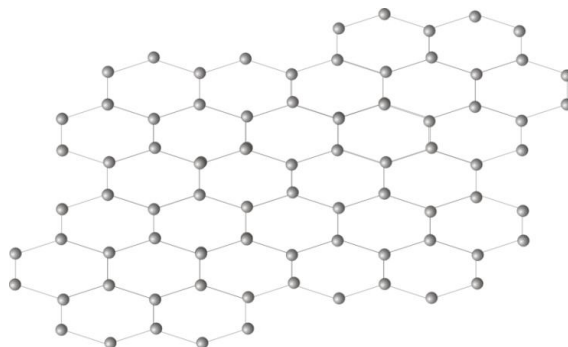
1.1.4 Voorbeelden van commercieel verkrijgbare biosensoren

Mensen met diabetes maken dagelijks gebruik van een glucosesensor om hun bloedsuikergehalte te bepalen. Hiervoor is een druppel bloed reeds voldoende. Glucose oxidase breekt glucose af waarbij elektronen worden vrijgegeven. Het zijn deze elektronen die door de elektrode van de sensor worden opgenomen zodat er een stroom ontstaat. De grootte van de stroom is afhankelijk van de hoeveelheid glucoseoxidase in het bloed wat evenredig is met het glucosegehalte. De glucosesensor is een voorbeeld van een biosensor (3).

Een ander voorbeeld is de zwangerschapstest. Deze test gaat na of Humaan ChorionGonadotrofine (HCG) aanwezig is in de urine van de vrouw. HCG wordt geproduceerd door de embryo en is dus een indicator voor een zwangerschap (4)(5). Een zwangerschap kan worden aangetoond doordat de urine een kleurverandering op een stripje initieert bij aanwezigheid van HCG

1.2 Grafeen en Carbon Nanowalls

Grafeen is een veelvoorkomend materiaal, vooral in de vorm van grafiet. Dit grafiet bestaat uit miljoenen lagen grafeen die door middel van zwakke aantrekkingskrachten (Van der Waals krachten) aan elkaar hangen (6)(7)(8). Het wordt onder andere gebruikt als potloodvulling. Een enkele laag grafeen wordt gevormd door koolstofatomen die een tweedimensionaal netwerk van aaneengeschakelde hexagonen vormen (Figuur 2).



Figuur 2: Netwerk van aaneengeschakelde koolstofatomen in de vorm van hexagonen (9)

Het feit dat grafeen uit één laag koolstofatomen bestaat, maakt het een interessant materiaal met speciale elektrische geleidingseigenschappen. Zo zal de geleiding in grafeen steeds boven een bepaalde waarde blijven, ook bij een minimaal aantal ladingsdragers. Ook vertonen de ladingsdragers ballistisch transport bij kamertemperatuur wat wil zeggen dat het transport gebeurt zoals in een medium met verwaarloosbare weerstand. Dit komt doordat de ladingsdragers zich gedragen als Dirac fermionen (10). Het gevolg hiervan is dat de geleiding in één laag grafeen vele malen hoger ligt dan de geleiding in commercieel Silicium (11). Verder is het Klein effect aanwezig in grafeen wat wil zeggen dat er een onbeperkte *tunneling* van relativistische deeltjes doorheen hoge potentiële barrières plaatsvindt (10). De aanwezigheid van deze eigenschappen maakt grafeen een interessante en passende structuur voor verder gebruik in koolstofgebaseerde elektronica (12). Hierbij komt dat grafeen, net als diamant, uitsluitend bestaat uit koolstofatomen. Dit maakt dat grafeen, mits gebruik van de juiste protocols, een goed oppervlak vormt voor de aanhechting van verscheidene biomoleculen, waaronder DNA (13).

Een algemeen probleem in de onderzoekswereld is het verkrijgen van grafeen. Dit kan door isolatie van grafeen uit grafiet. Er zijn verschillende manieren om dit te verwezenlijken. Eén ervan is micromechanische klieving van *Highly Oriented Pyrolytic Graphite* (HOPG) (6)(7)(8). HOPG is een relatief nieuwe vorm van zeer puur koolstof en is opgebouwd uit vele lagen grafeen. De krachten binnen de lagen zijn veel groter dan deze tussen de verschillende lagen wat ideaal is voor onze doeleinden doordat de bindingen tussen de lagen eerder breken dan deze binnen de lagen (zie 2.3). Een groot nadeel van deze methode is echter dat het moeilijk is om puur grafeen te bekomen, de verkregen *flakes* zijn vooral grafiet*flakes* van enkele koolstoflagen dik. Een bijkomend probleem is de detectie van deze enkellagige grafeen*flakes* tussen de duizenden dikkere grafiet*flakes*. Het gebruik van de juiste substraten en microscoopfilters zou hierbij kunnen helpen (14). Een tweede methode die toelaat grafeen te isoleren is het “oplossen” van schilfers HOPG in chloroform (CHCl_3), methanol (MeOH) of isopropanol (IPA) door middel van Ultrasonie (US) trillingen. Een groot voordeel is dat het eenvoudig is. Bijkomend is er het feit dat, in theorie, door middel van de *soneringstijd* te wijzigen de grootte van de flakes kan aangepast worden. Dit zal onderzocht worden tijdens de stage. Een nadeel van deze techniek is echter dat de *flakes* snel te klein zijn voor verdere doeleinden en de aanwezigheid van droogvlekken en vuil op de stalen. Een derde manier is het groeien van grafeen-achtige structuren door middel van *Microwave Plasma- Enhanced*

Chemical Vapour Deposition (MW PECVD), dit geeft zogenaamde Carbon Nanowalls (CNWs) (15)(16)(17)(18)(19).



Figuur 3: Carbon Nanowalls verkregen door middel van MW PECVD (20)

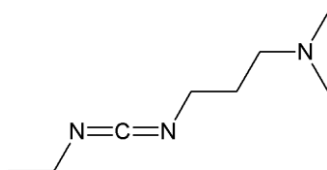
Er is reeds bewijs gevonden dat grafen gemodificeerd kan worden met DNA en dat verschillen in fluorescentie kunnen gedetecteerd worden tussen hybridisatie met complementair DNA en single mismatch DNA (21). Verder onderzoek is echter nodig om de functionalisatie meer reproduceerbaar te maken.

1.3 DNA-eigenschappen en binding

Tijdens deze thesis wordt gekozen voor het gebruik van DNA als gevoelige biologische component. De afkorting DNA staat voor deoxyribonucleïnezuur. DNA is opgebouwd uit verschillende componenten. Enerzijds zijn er de suikergroepen en de fosfaatgroepen die samen de ‘ruggengraat’ van het DNA vormen. Anderzijds zijn er de basen die aan de suikergroep gebonden zijn. Er zijn vier verschillende basen namelijk Adenine, Guanine, Thymine en Cytosine. Wanneer het DNA bestaat uit één ruggengraat met de basen spreekt men van enkelstrengig DNA. In de meeste gevallen komt DNA echter voor in de vorm van twee aaneengeschakelde strengen. Dit is mogelijk doordat de basen van twee enkele strengen DNA aan elkaar kunnen binden door vorming van waterstofbruggen. Deze binding gebeurt specifiek waarbij Adenine en Guanine binden aan respectievelijk Thymine en Cytosine.

De volgorde van de basen is bepalend voor de genetische informatie die het DNA bevat en is voor iedereen verschillend. Toch zijn er bepaalde stukjes DNA die bij gezonde personen

identiek zijn. Wanneer er echter een mutatie aanwezig is, waarbij de basen niet in de juiste volgorde staan of enkele basen vervangen zijn door andere basen, kan men in sommige gevallen spreken van een genetische aandoening. Bij verschillende aandoeningen is geweten welke mutatie aanwezig is waardoor DNA heel belangrijk kan zijn voor de opsporing ervan. Dit is de reden waarom in deze thesis onderzoek wordt gedaan naar een DNA-gebaseerde biosensor. Een probleem is echter om het DNA aan het grafeenoppervlak te binden. Tijdens deze stage wordt het gebruik van 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (Figuur 4) (EDC) onderzocht voor deze binding. Dit is een betrouwbare en gekende methode die reeds gebruikt wordt voor de biologische modificatie van diamantoppervlakken (22)(23)(24)(21).

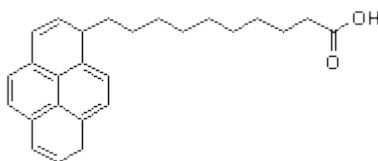


Figuur 4: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (25)

1.4 De aanhechting van 1-Pyrenedecanoic Acid aan grafeen

De PDA-methode is een nieuwe methode in onze onderzoeksgroep waardoor het onderzoek in zijn kinderschoenen staat. PDA is een molecule dat bestaat uit 4 aromatische ringen, een koolstofketen en een carboxylgroep (Figuur 5). Het is een molecule met fluorescente eigenschappen. De excitatiegolflengte bedraagt 340 nm en de emissiegolflengtes zijn 375 en 395 nm (26).

De aanhechting van het PDA-molecule aan grafeen gebeurt door middel van π - π interacties tussen de aromatische ringen en het grafeen. Dit maakt dat het molecule rechtop staat met de carboxylgroep naar boven gericht. Deze carboxylgroep is ideaal voor toepassing van het EDC-protocol (22)(23)(24)(21)(27).



Figuur 5: De structuur van 1-Pyrenedecanoic acid (PDA) (26)

1.5 Analysetechnieken

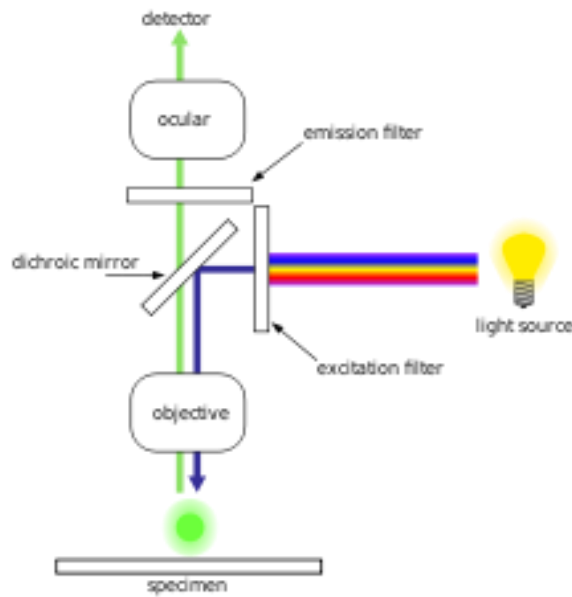
Voor de analyse van de verschillende stalen worden verschillende technieken gebruikt. De stalen waarop fluorescent gelabeld DNA aanwezig is worden bekeken met de fluorescentiemicroscop (Figuur 6). Ook wordt er tijdens deze stage gebruik gemaakt van contacthoekmetingen om de hydrofobiciteit van het oppervlak te bestuderen en fluorescentiespectroscopie voor de detectie van fluorescent PDA op de stalen.

1.5.1 Technieken op basis van fluorescentie

Fluorescentie is een fysisch proces waarbij moleculen licht (in de vorm van hoog-energetische fotonen) absorberen waardoor ze in een aangeslagen toestand belanden. Vervolgens vallen ze terug naar de grondtoestand door energie te verliezen in de vorm van een foton met een lagere energie. De lagere energie van het foton resulteert in licht met een langere golflengte dan het licht dat geabsorbeerd werd. Niet elk molecuule heeft fluorescente eigenschappen waardoor de technieken op basis van fluorescentie niet altijd kunnen toegepast worden. Tijdens deze stage worden twee verschillende technieken op basis van fluorescentie toegepast. Ten eerste wordt gebruik gemaakt van conventionele fluorescentiemicroscopie, vervolgens zal ook fluorescentiespectroscopie aan bod komen.

Fluorescentiemicroscopie

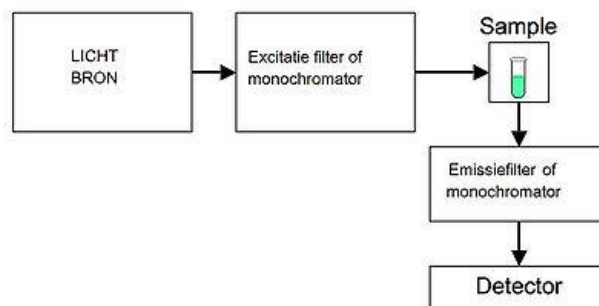
Bij de fluorescentiemicroscop wordt licht uitgezonden door een lichtbron en dit passeert een excitatiefilter waardoor enkel een bepaalde golflengte doorgelaten wordt. Deze golflengte wordt weerkaatst door een dichroïsche spiegel en gaat door een objectief naar het staal. Het fluorofoor waarmee het DNA gelabeld is, absorbeert dit licht en zal fluorescentie uitstoten. Deze fluorescentie heeft door energieverlies een grotere golflengte dan het geabsorbeerde licht en wordt doorgelaten door de dichroïsche spiegel. Vervolgens zal het de emissiefilter en het oculair passeren om daarna gedetecteerd te worden (Figuur 6) (28)(29).



Figuur 6: Werking van de fluorescenciemicroscop (30)

Fluorescentiespectroscopie

Fluorescentiespectroscopie wordt uitgevoerd met een fluorimeter (Figuur 7) en kan gebruikt worden om fluorescente stoffen aan te tonen en te identificeren. Dit is mogelijk doordat elke fluorescente stof specifieke excitatie- en emissiespectra heeft. Deze golflengten worden ingesteld in de fluorimeter waardoor de intensiteit van het licht dat opgevangen wordt specifiek is voor de stof die je wilt detecteren. Hierdoor kan de aanwezigheid van een bepaalde fluorescente stof aangetoond worden en is relatieve kwantiteitsbepaling tussen verschillende stalen mogelijk (31)(32).



Figuur 7: Opbouw van de fluorimeter met een lichtbron, een detector, een staalhouder en twee filters (37)

De lichtbron in fluorescentiespectroscopie stoot UV-licht uit wat het staal exciteert. Tussen de lichtbron en het staal is een filter of monochromator aanwezig welke ingesteld kan worden op een bepaalde golflengte. Dit heeft te maken met de eigenschap dat elke fluorescente stof een specifieke excitatiegolflengte heeft. Wanneer de excitatiefilter juist is ingesteld wordt enkel licht met de excitatiegolflengte van de te detecteren stof doorgelaten. Dit heeft als gevolg dat enkel deze stof wordt geëxciteerd wat een verkleining van de ruis tot gevolg heeft. Excitatie van een fluorescente stof door licht komt overeen met een opname van energie (in de vorm van een foton) waardoor één of meerdere elektronen in een aangeslagen toestand belanden. Daarna vallen ze terug naar hun grondtoestand wat een uitstoot van energie betekent. De energie van het uitgestoten foton is lager dan deze van het opgenomen foton waardoor het uitgestoten licht een hogere golflengte heeft dan het opgenomen licht. Het uitgestoten licht passeert een emissiefilter om daarna in te vallen op de detector. Elke fluorescente stof heeft één of meerdere specifieke emissiegolflengtes voor het uitgestoten licht (31)(32).

1.5.2 Contacthoekmetingen

Alle soorten moleculen zijn op een bepaalde manier opgebouwd. Een gevolg hiervan is dat ze verschillende eigenschappen ten opzichte van water hebben. Wanneer een molecule graag in een waterige omgeving vertoeft spreekt men van hydrofiele moleculen. Hydrofiel betekent letterlijk 'houdt van water'. Indien een molecule echter afstoting vertoont ten opzichte van water is dit een hydrofoob molecule. Ook kan een molecule zowel hydrofiel als hydrofobe eigenschappen hebben. Dit komt doordat de bouwstenen van dit molecule beide eigenschappen vertonen. DNA is hier een voorbeeld van. Zoals besproken in 1.3 bestaat DNA uit een ruggengraat (suikergroepen en fosfaatgroepen) en basen. De ruggengraat van DNA heeft een hydrofiel karakter terwijl de basen een hydrofoob karakter hebben.

Het principe van hydrofobiciteit is handig bij moleculen die geen fluorescente eigenschappen vertonen. Daarom is er tijdens deze stage gebruik gemaakt van contacthoekmetingen. Doordat elk molecule specifieke eigenschappen ten opzichte van water heeft zal de contacthoek van een druppel water met het oppervlak veranderen naarmate moleculen aan het oppervlak gehecht zijn. Dit heeft als gevolg dat door middel van contacthoekmetingen kan bepaald worden of het oppervlak gefunctionaliseerd is met specifieke moleculen of niet (33).

1.6 Doelstellingen

Het doel van deze stage is om de aanmaak van grafeen op siliciumsubstraten te combineren met de aanhechting van DNA aan dit grafeenoppervlak. Dit gefunctionaliseerd grafeen is een ideaal oppervlak voor gebruik in biosensoren. Bij dit hoofddoel horen verschillende objectieven.

Ten eerste worden enkele methoden om grafeen te bekomen onderzocht. Zo worden er experimenten gedaan waarbij de *ultrasoneringstijd* van een HOPG-oplossing wordt gewijzigd om het effect te bepalen op de grootte en het aantal flakes op een siliciumstaal na *dipcoating*. Verwacht wordt dat een langere *ultrasoneringstijd* resulteert in een afname van de grootte van de *flakes* en een toename van het aantal *flakes* op het oppervlak.

Een volgend onderzoek wordt gedaan naar het binden van DNA aan CNWs. Hierbij wordt er specifiek gekeken naar het effect van het wijzigen van de incubatietijd van het EDC-protocol en aantonen van verschil in fluorescentie tussen EDC-negatieve en EDC-positieve stalen.

Ook worden er hybridisatie- en denaturatie-experimenten uitgevoerd. Als bijkomend onderzoek wordt gekeken naar het effect van de incubatietemperatuur. De vergelijking tussen de verschillende stalen gebeurt aan de hand van de beelden die genomen worden met de fluorescentiemicroscopie.

De aanhechting van vetzuren en DNA aan CNW stalen wordt ook onderzocht met behulp van contacthoekmetingen met water. Een laatste reeks experimenten wordt gedaan om te bepalen of PDA een goed linkermolecule is om DNA aan grafeen*flakes* te hechten. De analyse van de verschillende stalen gebeurt bij dit experiment met fluorescentiespectroscopie.

2. Materiaal en methoden

2.1 Silicium substraten

Er wordt gebruik gemaakt van Siliciumsubstraten (Silicon technology Corporation, Japan) bestaande uit silicium (Si) bedekt met een laag siliciumoxide (SiO_2). De oxidelaag heeft een dikte van 300 nm wat verschillende voordelen heeft t.o.v. oxides met een dikte van 100 nm: een dikkere isolerende laag SiO_2 zorgt voor een kleiner effect van het halfgeleidend Si op elektrische meetresultaten en er is een contrast waarneembaar tussen het SiO_2 en het grafeen onder de microscoop (14).

De plaatjes worden in de gewenste vorm en grootte gesneden met een glassnijder waarna ze kunnen gereinigd worden.

2.2 Reinigen van silicium substraten

De Siliciumsubstraten dienen steeds gereinigd te worden vóór grafeenaanhechting. Dit wordt gedaan door de stalen gedurende 10 minuten in het ultrasoon (US) bad te plaatsen in een zeepoplossing. Vervolgens worden ze goed gespoeld met gedestilleerd water. Daarna worden ze gedurende 10 minuten in aceton (VWR, V.S.) in het US bad geplaatst om achteraf gedurende 15 minuten in isopropanol (VWR, V.S.) op de hotplate (120°C) te staan. Om af te sluiten worden de stalen droog geblazen waarna het grafeen kan aangehecht worden.

2.3 Aanhechting van grafeen

Tijdens de stage zijn verschillende manieren gebruikt voor de aanhechting van grafeen aan de siliciumsubstraten. Een eerste methode is de tapemethode of micromechanische klieving. Hierbij wordt tape op een stukje HOPG geplakt en er weer afgehaald waardoor er grafiet op

de tape achterblijft. Vervolgens wordt de tape verschillende malen dichtgevouwen en weer opengevouwen waardoor het grafiet gesplitst wordt en de lagen dunner worden. Uiteindelijk wordt de tape op een siliciumsubstraat geplakt en er weer afgehaald. Dit heeft als gevolg dat er stukjes grafiet en grafeen op het oppervlak achterblijven in de vorm van *flakes* (6)(7)(8).

Een tweede methode is het “oplossen” van schilfers HOPG in methanol, IPA of chloroform (CHCl_3) (Sigma Aldrich, België). Dit gebeurt door de vloeistof met grafietschilfers te trillen met behulp van een ultrasoonhoorn en wordt gedaan tot de oplossing een donkere kleur heeft en er geen grote schilfers meer aanwezig zijn. Deze oplossing wordt dan door middel van *dipcoating* of *dropcasting* op de siliciumplaatjes aangebracht waardoor bij opdroging het grafiet en grafeen op het oppervlak hangt. Bij *dipcoating* worden de stalen in de oplossing gedipt waardoor er flakes aan het oppervlak blijven plakken. Bij *dropcasting* daarentegen worden druppels HOPG-oplossing op het substraat gedaan zodat bij opdrogen flakes op het oppervlak achterblijven. Voor het verkrijgen van kleinere flakes kan de oplossing gecentrifugeerd worden zodat de grote stukken flakes neerslaan. Daarna wordt het supernatans aangebracht op het siliciumsubstraat.

Er wordt ook gebruik gemaakt van *Carbon Nanowalls* (CNWs) welke gegroeid werden door middel van MW PECVD. De structuren die zo verkregen worden zijn rechtopstaande netwerken van grafeen van enkele lagen dik (15)(16)(17)(18). Elk substraat dat een temperatuur van 700°C kan verdragen is geschikt voor de groei van CNWs. In dit geval wordt gebruik gemaakt van Silicium. Een voordeel van deze techniek is dat biologische functionalisatie, welke nodig is tijdens dit onderzoek, gemakkelijker is door de vele opstaande wanden welke waterstofgetermineerd zijn (Figuur 3). De stalen met CNWs worden gemaakt in het Vlaams Instituut voor Technologisch Onderzoek (VITO). (19)

2.4 Aanhechting van PDA

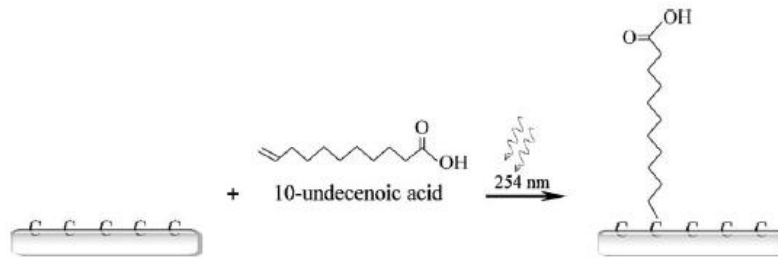
Het onderzoek naar de bruikbaarheid van PDA (Fluka analytica, V.S.) voor een DNA-gebaseerde biosensor is nog relatief nieuw waardoor nog gezocht wordt naar een goed protocol. Tijdens deze stage worden verschillende protocols voor verschillende stalen gebruikt.

Bij het eerste protocol wordt een PDA-oplossing gemaakt van 5 mM in DMF. Vervolgens worden drie siliciumstalen bedekt met deze PDA-oplossing. Om opdroging tegen te gaan worden er druppels DMF (VWR, V.S.) rond de stalen geplaatst maar ook wordt er geregeld extra PDA-oplossing aan de stalen toegevoegd. De drie stalen worden gedurende respectievelijk 1 uur, 2 uur en 3,5 uur geïncubeerd op kamertemperatuur. Vervolgens worden ze gedurende 15 minuten gespoeld in DMF om daarna droog geblazen te worden (34).

Een tweede soort stalen zijn tapestalen. Deze tape lost op in DMF dus wordt gebruik gemaakt van methanol als oplosmiddel. De concentratie van de oplossing bedraagt 1 mM. De stalen worden bedekt met PDA-oplossing en uitdroging wordt tegengegaan door geregeld PDA-oplossing toe te voegen. De incubatie duurt 3,5 uur en gebeurt op kamertemperatuur waarna de stalen gedurende 15 minuten worden gespoeld in methanol en vervolgens droog geblazen.

2.5 Vetzuuraanhechting

Voordat de aanhechting van DNA kan plaatsvinden worden vetzuren als linkermoleculen op de stalen aangebracht. Hiervoor worden de stalen op glazen dekglasjes gelegd. Vervolgens worden de vetzuren aangebracht, tijdens deze stage wordt 10-undecenoic acid (10-UDA) (Acros Organics, V.S.) gebruikt. Om er voor te zorgen dat het vetzuur een dunne homogene film vormt boven de stalen en om de UV-lamp en behuizing te beschermen worden de stalen bedekt met een kwartsglaasje. Kwarts wordt gebruikt omdat het geen licht absorbeert in het UV-spectrum. Nu kunnen de stalen gedurende 20 uur belicht worden met UV-licht met een golflengte van 254 nm (Figuur 8). Dit hele proces vindt plaats in een glovebox in stikstofomgeving. Nadat de stalen belicht zijn kunnen ze uit de glovebox gehaald worden en gewassen worden door ze gedurende 30 minuten in ijsazijn bij een temperatuur van 95°C te leggen. Vervolgens worden ze 3 maal tien minuten gespoeld in gedestilleerd water.

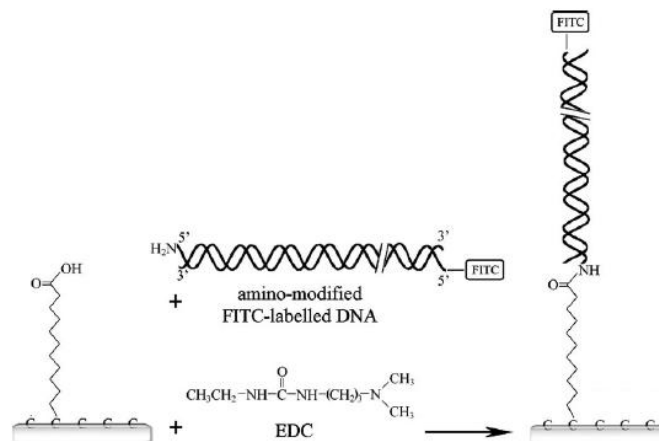


Figuur 8: Vetzuuraanhechting door middel van belichting met 254 nm UV-licht (22)

10-undecenoic acid heeft een uiteinde met een dubbele binding tussen twee koolstoffen welke verbroken wordt door de beschijning met UV-licht. Vervolgens vindt er een covalente binding plaats tussen het vetzuur en het waterstof-getermineerde koolstofoppervlak van het grafeen. Het andere uiteinde van het vetzuur bestaat uit een carboxyl (COOH)-groep welke ideaal is om het NH₂-getermineerd DNA aan te koppelen door middel van een peptidebinding (22)(23)(24)(21).

2.6 Aanhechting van DNA

Voor de aanhechting van het probe DNA (BIOMED, Diepenbeek) wordt gebruik gemaakt van het EDC-protocol (Figuur 9). EDC (Thermo Scientific, Amerika) dient hier als crosslinker om het aanhechten van het DNA gemakkelijker te laten gebeuren. Het EDC molecule wordt zelf niet ingebouwd in het reactieproduct.



Figuur 9: EDC-protocol voor de aanhechting van fluorescent gelabeld DNA aan vetzuren (22)

Het ligand (DNA) wordt in 25 mM MES-buffer (pH6) toegevoegd en gedurende 30 minuten op kamertemperatuur geïncubeerd. De sequentie van het DNA is 5'-NH₂.C₆H₁₂-AAA-AAA-ACC-CCT-CGA-GCC-CAT-GTA-TAC-CCC-CGA-ACC-3'. De concentratie van de DNA-oplossing bedraagt 15 pmol/μl. Vervolgens wordt EDC opgelost in koude 25 mM MES-buffer (pH6) tot een finale concentratie van 50 mg/ml wordt verkregen. Aan elk staal wordt een volume van 15 μl EDC-oplossing aangebracht samen met 5 μl 25 mM MES-buffer (pH6). Dit wordt gedurende 4 uur geïncubeerd bij 4°C. De siliciumstalen worden op PDMS-lapjes (Dow Corning Silicones, V.S.) gelegd welke heel hydrofoob zijn zodat de EDC-oplossing beter op de stalen blijft. Daarna worden de stalen gedurende 5 minuten in 1x PBS-buffer (1.29M NaCl, 0.05 M Na₂HPO₄·2H₂O, 0.015 M KH₂PO₄, pH 7.4) gespoeld, gevolgd door twee spoelstappen in 2x SSC + 0,5% SDS (Sigma Aldrich, België) bij kamertemperatuur. Uiteindelijk worden de stalen bewaard in PBS. De hoeveelheden van DNA- en EDC-oplossing variëren als gevolg van de grootte van de stalen. Op kleine stalen (ongeveer 0,25 cm²) wordt 20 μl DNA-oplossing en 10 μl EDC-oplossing toegevoegd terwijl dit bij grotere stalen meer is (21)(22)(23)(24).

2.7 DNA-hybridisatie

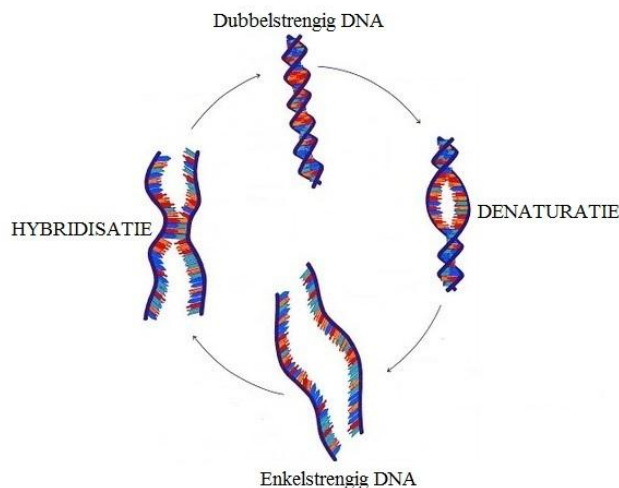
Hybridisatie van DNA houdt in dat twee enkele strengen DNA aan elkaar hechten via basepaarvorming zodat een dubbele streng wordt bekomen (Figuur 10). De basen hechten specifiek aan elkaar waarbij Adenine en Thymin respectievelijk Cytosine en Guanine een koppel vormen (1.3). Adenine en Thymin doen dit door middel van twee waterstofbruggen terwijl Cytosine en Guanine een stevigere koppeling vormen met drie bindingen.

Indien het DNA dat aan het oppervlak werd gebonden enkelstrengig is, dient achteraf gehybridiseerd te worden met complementair DNA. Dit DNA wordt opgelost in hybridisatiebuffer (Invitrogen, België) zodat een concentratie verkregen wordt die ongeveer 3 maal groter is dan deze van de probe DNA-oplossing. De stalen worden 2 u geïncubeerd in de oven, de grote stalen (volledige siliciumplaatjes) met 30 μl oplossing en de kleine met 20 μl. Tijdens deze stage worden experimenten gedaan bij verschillende temperaturen, zo wordt er geïncubeerd bij 40°C of bij 60°C. De stalen worden daarna gedurende 10 minuten gespoeld

met 2x SSC + 0,5% SDS buffer om vervolgens gedurende 10 minuten in 0,2x SSC buffer te worden gespoeld. Dit verschil in zoutconcentratie zorgt ervoor dat het DNA dat niet goed gehybridiseerd is weggespoeld wordt. De volgende spoelbeurt gebeurt gedurende 30 minuten in 0,2% SSC-buffer bij een temperatuur die 5°C lager ligt dan de hybridisatietemperatuur. De stalen worden bewaard in 1x PBS-buffer (21).

2.8 DNA-denaturatie

De denaturatie van DNA houdt in dat de bindingen tussen de basen van de verschillende strengen verbroken worden waarbij eerst de zwakkere koppeling tussen Adenine en Thymine verbroken worden, gevolgd door de scheiding van Cytosine en Guanine (Figuur 10). In dit geval zal het fluorescent gelabeld DNA, dat eerder gehybridiseerd werd aan het probe DNA, loslaten van het probe DNA. Dit heeft als gevolg dat nog enkel het probe DNA aan het oppervlak aanwezig is. Voor de denaturatie van het DNA dienen de stalen gedurende 30 minuten in Natriumhydroxide (NaOH) 0,1 M bij een temperatuur van 50°C gehouden worden. Vervolgens worden de stalen 3 maal 10 minuten in 1x PBS gespoeld om het gedenateerde fluorescent gelabeld DNA te verwijderen. Daarna kunnen de stalen bewaard worden in 1x PBS (21).



Figuur 10: De denaturatie van dubbelstrengig DNA tot enkelstrengig DNA en de hybridisatie van dit enkelstrengig DNA tot dubbelstrengig DNA (35)

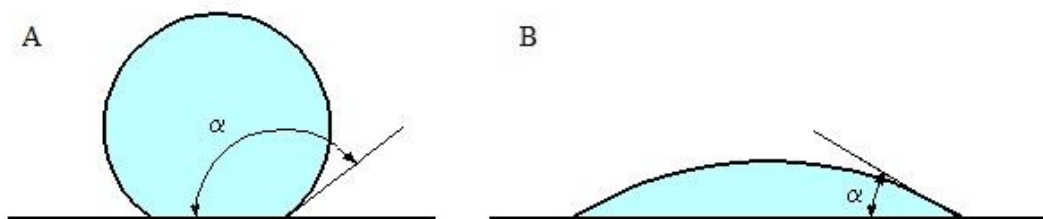
2.9 Fluorescentiemicroscopie

De fluorescentie microscopie wordt gedaan met een Nikon eclipse 80i microscoop met een kwiklamp. Er wordt gebruik gemaakt van een filterset aangepast aan Alexa 488 (Ex 482/35 nm, DM 506, Em 536/40). Voor alle experimenten zijn dezelfde instellingen van de fluorescentiemicroscoop gebruikt om vergelijking mogelijk te maken. Er wordt gebruik gemaakt van een fast focus van 800 x 600 fine, een quality van 800 x 600 fine, een blootstelling van 400ms en een gain van 8x (28)(29).

2.10 Contacthoekmetingen

Voor de contacthoekmetingen wordt gebruik gemaakt van de Contact Angle System OCA van Dataphysics Duitsland.

Bij de contacthoekmetingen wordt de contacthoek aan beide kanten van de druppel gemeten. Van deze twee waarden wordt het gemiddelde berekend om een nauwkeuriger beeld te krijgen van de eigenschappen van het oppervlak (33).



Figuur 11: Principe van contacthoekmetingen, in geval A is het oppervlak zeer hydrofoob waardoor de waterdruppel sterk afgestoten wordt van het oppervlak met een grote contacthoek tot gevolg, foto B is een foto van een hydrofiel oppervlak waarbij de druppel wordt aangetrokken zodat een kleine contacthoek wordt gevormd (36)

De metingen van de contacthoeken worden uitgevoerd met een frequentie van 1 meting per seconde. Daar de waterdruppels op de stalen en het meettoestel bij de eerste metingen nog niet stabiel zijn worden de resultaten vanaf tien seconden na het begin van de meting gebruikt.

Dit maakt dat de bekomen contacthoeken minder fluctueren. Om de invloed van uitdroging bij elk staal gelijk te maken maar toch genoeg resultaten te bekomen, zijn van elk staal twintig opeenvolgende metingen genomen voor resultatenverwerking. Van deze twintig contacthoeken wordt een gemiddelde contacthoek berekend.

2.11 Fluorescentiespectroscopie

Er wordt gebruik gemaakt van een fluorescentiespectrometer van Photon Technology International (Engeland).

De fluorescentiespectra worden weergegeven in eenzelfde figuur zodat de verschillende stalen met elkaar kunnen vergeleken worden.

2.12 Verwerking met ImageJ

Er zijn verschillende soorten resultaten waardoor verschillende manieren van verwerking zijn toegepast.

Een eerste soort resultaten zijn beelden die opgenomen zijn met de gewone lichtmicroscop. Deze beelden zijn gewone foto's van de stalen met een sterke vergroting. Uit deze foto's moeten verscheidene resultaten gehaald worden waaronder de grootte van de flakes, het aantal flakes, etc. Om dit te bekomen dient eerst de schaal ingesteld te worden. Dit wordt gedaan door een bepaalde lengte aan te duiden en hiervan de werkelijke afstand in te stellen. Vervolgens wordt de foto omgezet naar een 8-bit type zodat het programma enkel de *flakes* inbrengt in de resultaten. Vervolgens wordt een *threshold* ingesteld waarbij alle waarden onder een bepaalde lichtintensiteit (de *flakes* zijn donker op het beeld en het silicium is licht) aanzien worden als flakes. Uiteindelijk kan de analyse van de flakes gedaan worden door ImageJ.

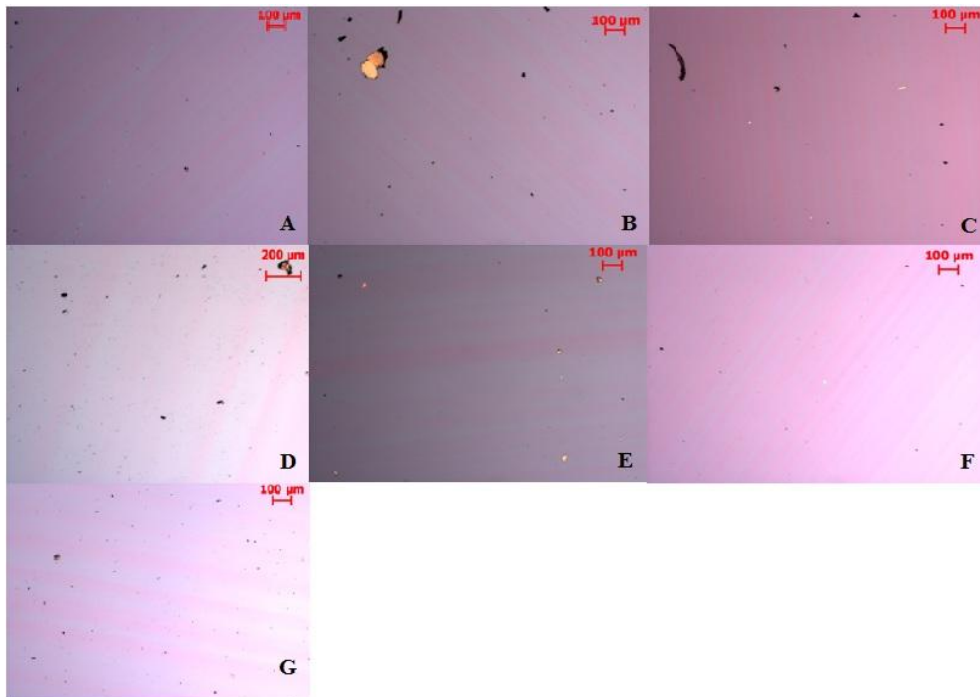
Een tweede soort resultaten zijn de beelden afkomstig van de fluorescentiemicroscop. Hierbij gebeurt de analyse aan de hand van het bepalen van de gemiddelde lichtintensiteit afkomstig van fluorescentie. Er wordt dus niet zozeer gebruik gemaakt van een minimale

waarde van lichtintensiteit die ingesteld moet worden om te kunnen spreken van fluorescentie. Een eerste stap voor de analyse is de instelling van een '*region of interest*' (ROI). Dit is de regio op de foto waar de waargenomen fluorescentie het minste afhankelijk is van toeval. Zo worden de uitschieters gedeeltelijk verwijderd uit de resultaten. Eens een ROI is ingesteld wordt deze gebruikt voor alle beelden van de stalen die met elkaar vergeleken worden. Vervolgens wordt de gemiddelde waarde van lichtintensiteit bepaald door ImageJ.

3. Resultaten en Discussie

3.1 Ultrasoneringsexperimenten met Chloroform en Isopropanol

Zoals eerder vermeld, zijn er verschillende manieren voor het afzetten van grafeen/grafiet op een Siliciumoppervlak. Eén van deze manieren is het *dipcoaten* van het staal in chloroform (Figuur 12) of isopropanol (Figuur 13) waarin HOPG is ‘opgelost’. Voor het afbreken van de *flakes* in steeds kleinere stukken werd gebruik gemaakt van ultrasonering. Tijdens deze stage is een experiment gedaan waarbij gekeken wordt naar de effecten van de duur van de ultrasonering op de hoeveelheid en grootte van de flakes die achterblijven op het oppervlak na *dipcoating*.



Figuur 12: Ultrasoneringsexperiment in Chloroform. Foto A, B, C, D, E, F en G hebben een soneringstijd van respectievelijk 1 minuut, 5 minuten, 15 minuten, 30 minuten, 1 uur, 2 uur en 3 uur.

Doordat de foto's aan de ene kant donkerder zijn dan aan de andere kant is het moeilijk de threshold goed in te stellen in ImageJ. Dit heeft als gevolg dat verschillende *flakes* niet herkend worden terwijl op een andere positie op de foto *flakes* zijn waargenomen waar er

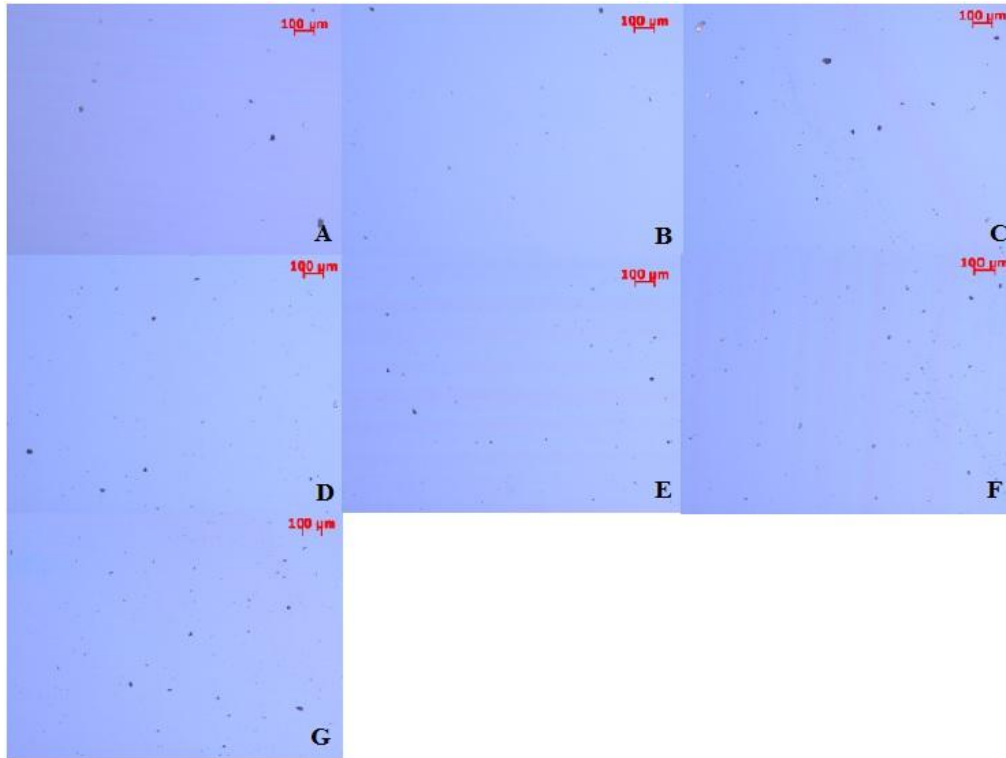
geen aanwezig zijn. Dit maakt dat de analyse van de data moeilijk is. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: De resultaten bekomen met ImageJ van de verschillende stalen met verschillende ultrasoneeringstijden. Als solvent is gebruik gemaakt van chloroform.

Staal	Aantal flakes	Gemiddelde Grootte (μm^2)	Oppervlaktefractie (%)
1 min chloroform	31	41,884	0,1
5 min chloroform	191	57,163	0,5
15 min chloroform	423	22,934	0,4
30 min chloroform	94	82,565	0,3
1 uur chloroform	167	10,148	0,1
2 uur chloroform	165	8,352	0,1
3 uur chloroform	172	24,494	0,2

Door middel van ultrasoneering wordt het HOPG gesplitst zodat de stukjes grafiet steeds kleiner worden. Dit zou zichtbaar moeten zijn in de resultaten. Wanneer echter de gemiddelde groottes van de *flakes* met elkaar vergeleken worden is er niet echt een patroon waar te nemen. Ook het aantal *flakes* vertoont geen patroon. Verwacht werd dat de gemiddelde grootte van de *flakes* afneemt naarmate de duur van ultrasoneering toeneemt. Het feit dat de resultaten niet overeenkomen met de verwachtingen kan verklaard worden door het probleem met de instellingen van de threshold. Ook is het zo dat bij een kleine vergroting enkel *flakes* worden waargenomen die een minimale grootte hebben. Zo worden de kleinste *flakes* niet opgenomen in de resultaten. Bij een sterke vergroting daarentegen wordt maar een klein gedeelte van het staal waargenomen. Je ziet dus nooit alle flakes of alle grootteordes van flakes in één beeld. Hierdoor zijn de resultaten vertekend en kunnen er geen uitspraken worden gedaan aan de hand van deze resultaten.

In volgend experiment is net hetzelfde protocol gevolgd, er is echter gebruik gemaakt van IPA in plaats van chloroform (Figuur 13). Hier is geen probleem opgetreden bij het maken van de beelden zodat het instellen van de threshold geen problemen gaf. De resultaten die bekomen zijn met ImageJ zijn dus betrouwbaarder dan deze die resulteren uit de foto's van Figuur 12.



Figuur 13: Ultrasoneringsexperiment in Isopropanol. Foto A, B, C, D, E, F en G hebben een soneringstijd van respectievelijk 1 minuut, 5 minuten, 15 minuten, 30 minuten, 1 uur, 2 uur en 3 uur

Wanneer de verschillende beelden met elkaar vergeleken worden is duidelijk te zien dat een stijgende ultrasoneringstijd een stijging in het aantal flakes tot gevolg heeft. Dit wordt beaamd door de resultaten die bekomen zijn met ImageJ (Tabel 2). De waarden voor het aantal flakes vertonen een duidelijk patroon waarbij ze oplopen van 28 tot 352. Enkel het experiment waarbij in totaal 1 uur is geultrasonereerd vertoont een onverwacht resultaat. Dit kan echter te verklaren zijn doordat de aanhechting van de flakes gedeeltelijk te wijten is aan de duur en snelheid van het *dipcoaten*. Indien dit staal sneller uit de vloeistof is genomen dan de andere stalen, hebben de flakes minder kans om aan het oppervlak te blijven hangen. Uit Figuur 13 kan niets besloten worden wat betreft de gemiddelde grootte van de flakes, hiervoor zijn de resultaten uit Tabel 2 nodig. Ook hier is een patroon waarneembaar. Naarmate de duur van de ultrasonering toeneemt daalt de gemiddelde grootte van de *flakes*. Dit komt doordat bij een langere ultrasonering het HOPG ook langer is blootgesteld aan de trillingen die de schilfers doen splitsen. Dit heeft als gevolg dat de kans op grote *flakes* groter is wanneer er 1 minuut is geultrasonereerd dan wanneer er langer wordt getrild. Ook hier is het staal waarbij 1 uur is geultrasonereerd een uitzondering. Dat deze resultaten afwijken van het patroon kan te wijten zijn aan toeval.

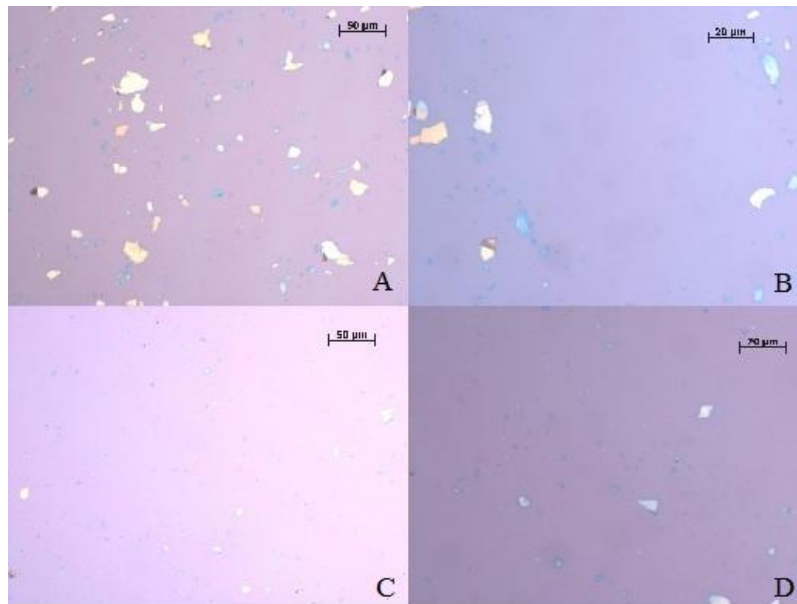
Tabel 2: De resultaten die bekomen zijn met ImageJ voor de foto's uit Figuur 13. Het solvent dat voor dit experiment is gebruikt is IPA

Staal	Aantal flakes	Gemiddelde Grootte (μm^2)	Oppervlaktefractie (%)
1 minuut isopropanol	28	153,331	0,2
5 minuten isopropanol	45	65,653	0,1
15 minuten isopropanol	224	39,774	0,4
30 minuten isopropanol	266	27,928	0,3
1 uur isopropanol	141	32,197	0,2
2 uur isopropanol	339	23,449	0,3
3 uur isopropanol	352	23,810	0,4

De oppervlaktefractie van de verschillende stalen bedraagt tussen 0,1% en 0,4%. Dit wil zeggen dat maar een klein deel van het oppervlak bedekt is met flakes. Wanneer er dus experimenten gedaan worden waarbij een zo groot mogelijk deel van het oppervlak bedekt moet zijn met *flakes* is dit geen goede methode.

Uit dit experiment kan besloten worden dat *flakes* op een oppervlak kunnen gezet worden door middel van *dipcoating* in een HOPG-oplossing. Afhankelijk van het doel van het staal kunnen verschillende ultrasonerings tijden gebruikt worden. Wanneer er veel kleine *flakes* nodig zijn kan gebruik gemaakt worden van een ultrasoneringsduur van 3 uur. Indien echter de *flakes* groot moeten zijn kan beter een duur van 1 minuut ingesteld worden.

Daar er tijdens deze stage veel gebruik is gemaakt van de tapemethode worden hier enkele foto's getoond van stalen die met deze methode gemaakt zijn (Figuur 14).



Figuur 14: Beelden van stalen die gemaakt zijn met de tapmethode. Foto A en B zijn van hetzelfde staal met respectievelijk 20x en 50x vergroting. Ook foto C en D zijn van hetzelfde staal met respectievelijk 20x en 50x vergroting

Foto A vertoont voornamelijk grote *flakes* met enkele kleinere *flakes*. De *flakes* op dit staal zijn ook vrij dik. Foto B is een foto van hetzelfde staal met een sterkere vergroting. Ook dit beeld toont grote, dikke *flakes* met enkele kleinere *flakes*. Foto C daarentegen geeft bijna enkel kleine *flakes* weer. Het aandeel grote *flakes* is hier zeer klein. Dit is ook te zien op foto D waar maar vier grotere *flakes* aanwezig zijn. Uit deze foto's kan besloten worden dat ook met de tapmethode de grootte van de *flakes* varieert. Indien er vele kleine *flakes* nodig zijn voor de experimenten wordt de tape vele keren dichtgevouwen zodat de HOPG-schilfers vaak gesplitst worden. Indien er echter meer grote *flakes* aanwezig moeten zijn kan de tape minder worden dichtgevouwen. De hoeveelheid *flakes* kan ook geregeld worden, dit wordt gedaan door de hoeveelheid HOPG op de tape aan te passen. Indien er meer HOPG aanwezig is op de tape zullen er meer *flakes* op het staal aangebracht worden.

3.2 Effect van vetzuur- en DNA-aanhechting op de contacthoek

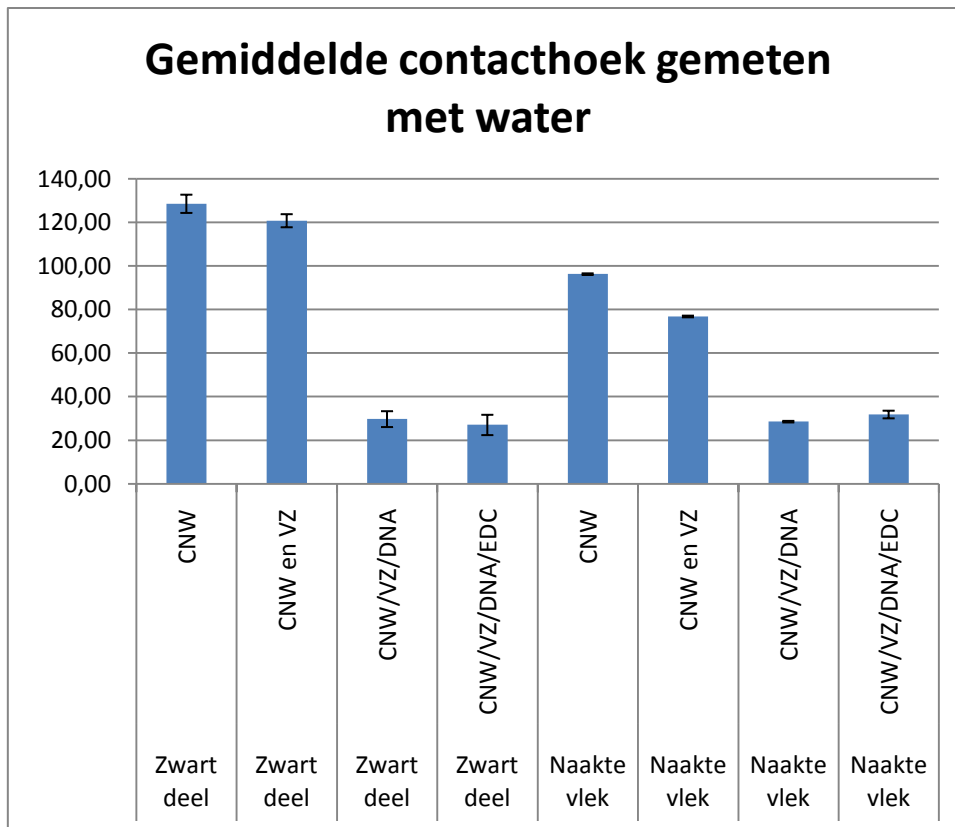
Vetzuren en DNA hebben een bepaalde hydrofobiciteit waardoor de aanhechting van deze moleculen aan het oppervlak een effect heeft op de contacthoek van water. Dit maakt dat

contacthoekmeting een andere manier is om te bepalen of functionalisatie van het oppervlak heeft plaatsgevonden. Tijdens deze stage werden na elke stap in het DNA-bindingsproces de contacthoeken van de verschillende stalen gemeten (Tabel 3 en Figuur 15). Bij de contacthoekmeting is onderscheid gemaakt tussen het zwarte deel van de stalen en de naakte vlek van de stalen. De oorzaak van dit verschil in CNW-stalen is een ongelijke verdeling van CNWs hebben op hun oppervlak. De randen van de stalen zijn zwart en dit is ook het gedeelte waar de CNWs zich vooral bevinden. De binnenkant van de stalen daarentegen is zilverkleurig wat wijst op een klein aantal CNWs, het aanwezige koolstof is amorf. Het is dus zo dat vooral de contacthoeken die gemeten zijn op het zwarte deel van de stalen van belang zijn. Maar ook de contacthoeken van de naakte vlek zijn aan de resultaten toegevoegd om een vergelijking te kunnen opmaken tussen beide delen.

Tabel 3: De gemiddelde contacthoeken en hun standaardafwijkingen van de verschillende stalen na een bepaalde stap in het DNA-bindingsproces. Water wordt gebruikt voor de contacthoekbepaling

	staal	gemiddelde contacthoek	standaardafwijking
<u>Zwart deel</u>	CNW	128,55	4,19
<u>Zwart deel</u>	CNW en VZ	120,79	3,00
<u>Zwart deel</u>	CNW/VZ/DNA	29,75	3,64
<u>Zwart deel</u>	CNW/VZ/DNA/EDC	27,08	4,66
<u>Naakte vlek</u>	CNW	96,26	0,37
<u>Naakte vlek</u>	CNW en VZ	76,86	0,39
<u>Naakte vlek</u>	CNW/VZ/DNA	28,59	0,36
<u>Naakte vlek</u>	CNW/VZ/DNA/EDC	31,87	1,76

Omdat de contacthoeken van de naakte vlekken niet zo van belang waren zijn er ook minder resultaten van de verschillende stalen zichtbaar waardoor de verdeling van de contacthoeken kleiner is. Dit is een verklaring voor het feit dat de standaardafwijking van de metingen van de naakte vlek kleiner zijn.

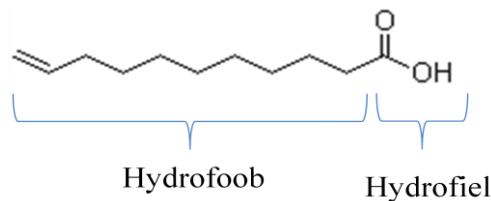


Figuur 15: De resultaten van de contacthoekmetingen uit Tabel 3 uitgezet in een grafiek

Er is een duidelijk verschil zichtbaar tussen de contacthoeken van het zwarte gedeelte en de naakte vlek van de CNW-stalen waar geen vetzuren (10-UDA) of DNA aan zijn gebonden. De waterdruppel vormt een grotere hoek op het zwarte gedeelte van de stalen dan op de naakte vlek wat betekent dat het zwarte gedeelte hydrofober is dan de naakte vlek. Dit is te verklaren door het feit dat het oppervlak van het zwarte gedeelte vooral bestaat uit CNWs en dus enkel koolstof bevat. Het overgrote deel van het oppervlak van de naakte vlek daarentegen bestaat uit silicium. Koolstof is hydrofober dan silicium met een grotere contacthoek tot gevolg.

Wanneer vetzuren op het oppervlak worden gebonden is er een verkleining van de contacthoek waar te nemen. Vetzuren bestaan echter uit verschillende delen die elk bepaalde eigenschappen ten opzichte van water hebben (Figuur 16). Enerzijds is er de lange koolstofketen die zeer hydrofoob is. Anderzijds is er de COOH-groep die een hydrofiel karakter heeft. De aanhechting van het vetzuur aan het CNW-oppervlak gebeurt door middel van een covalente binding waardoor de hydrofobe koolstofketen naar het oppervlak is gekeerd en de hydrofiel carboxylgroep het oppervlak vormt. Dit heeft als gevolg dat het hydrofiel

karakter van het vetzuur meer tot uiting komt wanneer enkel gekeken wordt naar het oppervlak van het staal. Hierdoor kan er dus een verkleining van de contacthoek waargenomen worden.



Figuur 16: De verschillende delen van 10-Undecenoic acid met hun affiniteit voor water

De verkleining van de contacthoek na vetzuuraanhechting is zowel waar te nemen bij de meting op het zwarte deel als op de naakte vlek waardoor kan vastgesteld worden dat de vetzuren zich op beide delen bevinden. Het is echter zo dat bij de naakte vlek het oppervlak vooral uit silicium bestaat en er amper CNWs aanwezig zijn. Er is wel veel koolstof aanwezig maar meer in de vorm van amorfe koolstof waarbij er geen bepaalde structuur is gevormd. Koppeling van de vetzuren aan het oppervlak met een covalente binding is dus niet vanzelfsprekend. Een verklaring kan echter zijn dat de vetzuren door middel van adsorptie aan de stalen hechten met een hydrofieler oppervlak tot gevolg.

Aanhechting van DNA aan de vetzuren heeft een uitgesproken effect, met name een daling van de contacthoek. De verklaring hiervoor is dat de basen van een DNA-streng hydrofoob zijn, de suiker- en fosfaatgroepen daarentegen zijn hydrofiel. Zoals besproken in 1.3 bevinden de basen zich aan de binnenkant van de streng en de fosfaatgroepen en de suiker aan de buitenkant. Dit heeft als gevolg dat het hydrofiel karakter van DNA meer tot uiting komt bij de metingen met een verkleining van de contacthoek tot gevolg. Een daling van de contacthoek van ongeveer 90° bij het zwarte gedeelte van het staal doet dus vermoeden dat het DNA effectief gebonden zit aan het oppervlak. Ook bij de EDC-negatieve stalen is een daling van de contacthoek waar te nemen waaruit blijkt dat ook hier DNA gebonden is aan het oppervlak. Dit zou niet het geval mogen zijn of toch in mindere mate dan bij de EDC-positieve stalen. Dit heeft als gevolg dat er niet echt een besluit kan getrokken worden of het DNA al dan niet op de verwachte manier gehecht is aan het staal.

De stalen die onderzocht zijn met contacthoekmetingen werden ook bekeken met de fluorescentiemicroscop. Hier werd echter geen noemenswaardig verschil waargenomen tussen DNA-negatieve en DNA-positieve stalen. Dit verschijnsel kan mogelijk verklaard worden door een verandering in de instellingen van de fluorescentiemicroscop maar dit is echter niet zeker. Een andere mogelijke verklaring voor deze resultaten is dat er gebruik is gemaakt van oude CNW-stalen die ook voor andere experimenten zijn gebruikt. Er zijn dus mogelijk nog moleculen aanwezig van de voorgaande experimenten waardoor er vertekening van de resultaten is. Er worden daarom geen fluorescentiebeelden van deze stalen getoond in de thesis. De getoonde fluorescentiebeelden in de volgende resultaten zijn afkomstig van andere stalen en andere experimenten.

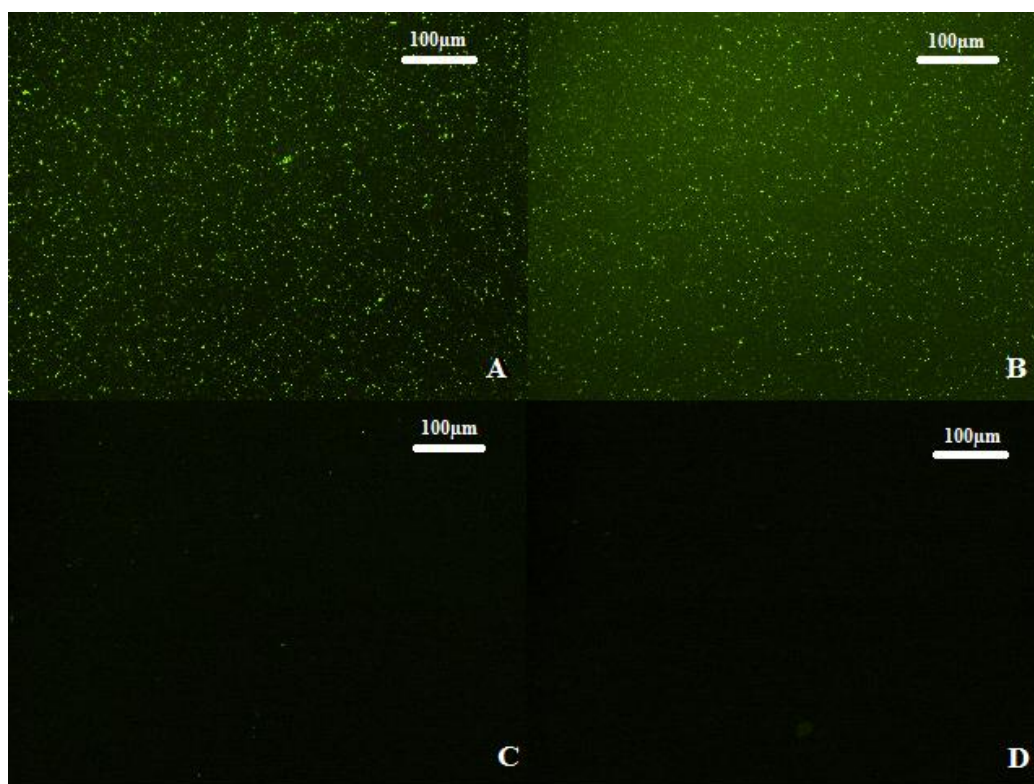
3.3 Invloed van incubatietijd van de EDC-reactie en vergelijking van EDC-negatieve en EDC-positieve stalen

Bij dit experiment wordt gebruik gemaakt van CNW-stalen waarop vetzuren zijn aangehecht (zie 2.5). Deze stalen ondergaan verschillende behandelingen (Tabel 4). Staal 1 is een staal dat EDC-positief is met een incubatietijd van 1 uur. Ook staal 2 is EDC-positief maar hier wordt een incubatietijd van 3 uur toegepast. Ter controle of EDC noodzakelijk is bij de aanhechting van DNA aan de CNWs is ook een EDC-negatief staal gemaakt met een incubatietijd van 3 uur, dit is staal 3. Het blankostaal (staal 4) is zowel EDC- als DNA-negatief en dient ter controle om te bepalen of het opgemeten signaal van de vorige stalen geen achtergrondsignaal is. In dit experiment wordt enkelstrengig probe DNA gebruikt dat reeds gelabeld is met Alexa 488. Dit heeft als gevolg dat er geen hybridisatiestappen meer dienen gedaan te worden voor de detectie met fluorescentiemetingen. Het voordeel hiervan is dat er minder stappen zijn die kunnen mislopen.

Tabel 4: De verschillende behandelingen die de stalen hebben ondergaan

Staal	EDC	DNA	Incubatietijd
1	+	+	1 uur
2	+	+	3 uur
3	-	+	3 uur
4	-	-	-

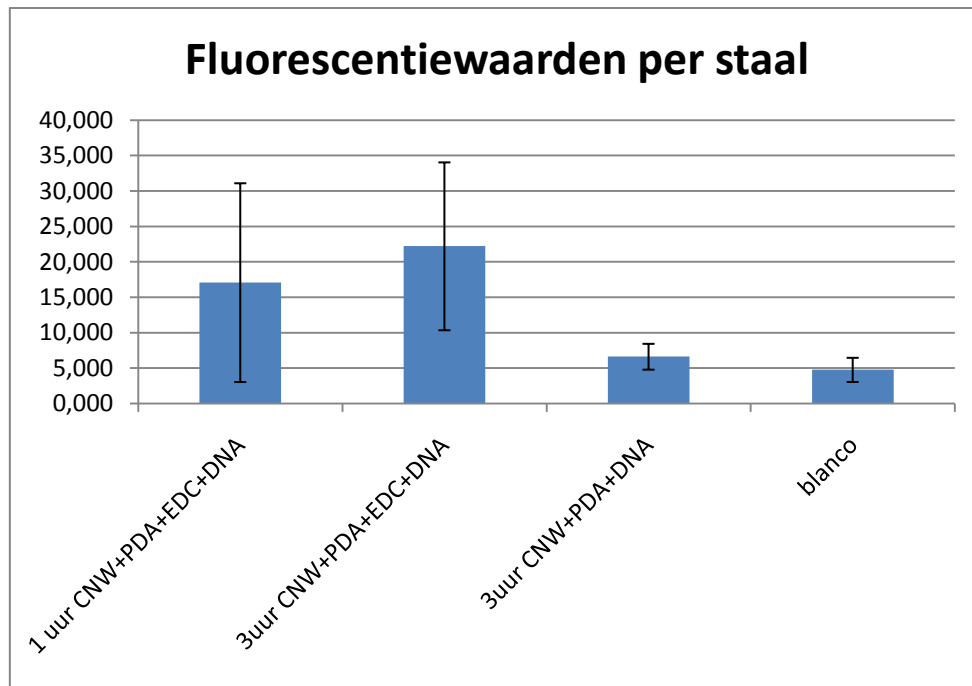
Daar het DNA fluorescent gelabeld is worden de stalen onderzocht met een fluorescentiemicroscop (Figuur 17). Foto A stelt staal 1 voor en vertoont duidelijk fluorescentie, dit in vergelijking met de foto van het blanco staal (foto D). Hieruit kan besloten worden dat de fluorescentie die zichtbaar is op foto A het gevolg is van de aanwezigheid van DNA en niet van achtergrondfluorescentie. Foto B is een foto van staal 2 dat een incubatietijd heeft gehad van 3 uur met een sterkere fluorescentie tot gevolg. De sterkere fluorescentie kan verklaard worden door het feit dat het DNA en de EDC meer tijd hebben gehad om aan het oppervlak te hechten. Hieruit kan dus besloten worden dat een langere incubatietijd beter is voor de hechting van DNA aan vetzuren. Wanneer foto C vergeleken wordt met foto B is te zien dat dit staal minder fluoresceert. Dit is te verklaren door de afwezigheid van EDC dat een katalysator is voor de bindingsreactie van DNA aan de vetzuren.



Figuur 17: Beelden gemaakt met de fluorescentiemicroscop. Foto A: 1 uur geïncubeerd en EDC-positief. Foto B: 3 uur geïncubeerd en EDC-positief. Foto C: 3 uur geïncubeerd en EDC-negatief. Foto D: blanco staal

De beelden van de stalen worden geanalyseerd met ImageJ zodat een gemiddelde fluorescentiewaarde bekomen wordt. Deze waarden worden uitgezet in een staafdiagram (Figuur 18). De resultaten die bekomen worden met ImageJ omvatten een gemiddelde waarde voor fluorescentie, de maximale en minimale fluorescentiewaarde en een standaardafwijking. Bij deze stalen is de fluorescentie niet homogeen verdeeld zodat sommige plaatsen heel fluorescent zijn terwijl andere plaatsen een fluorescentiewaarde van bijna nul geven. Dit heeft als gevolg dat de standaardafwijkingen vrij groot zijn voor de positieve stalen. De negatieve stalen zijn over het algemeen weinig fluorescent zodat de fluorescentiewaarden niet zoveel uiteen liggen met een kleinere standaardafwijking tot gevolg.

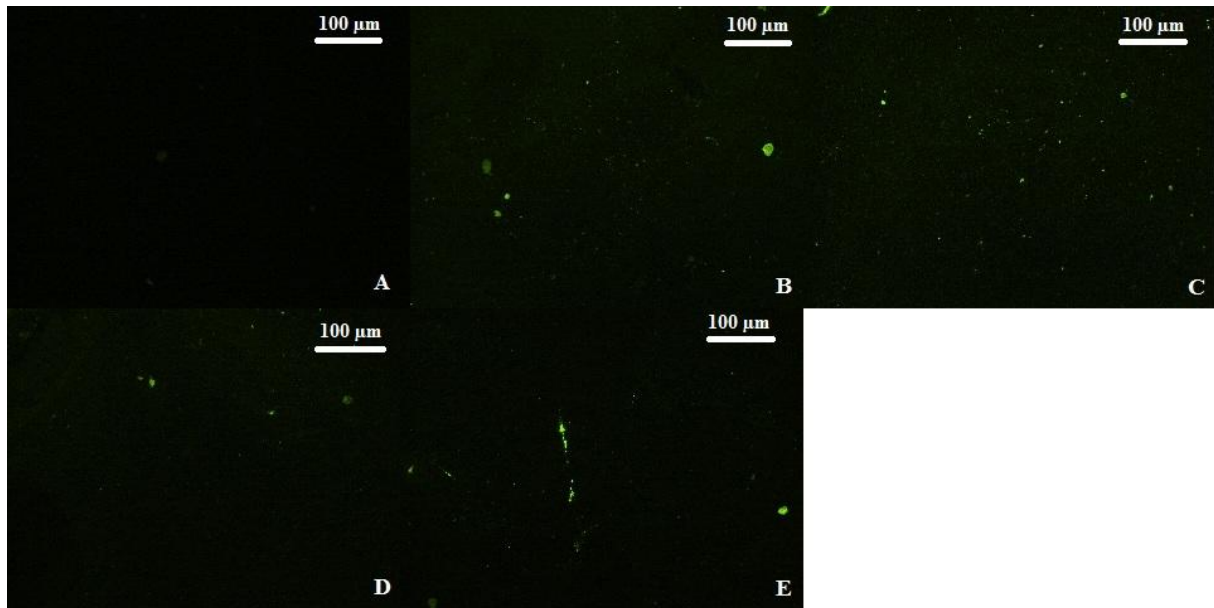
Het staafdiagram toont een verschil tussen de gemiddelde waarde van het staal met 1 uur incubatietijd (staal 1) en het staal met 3 uur incubatietijd (staal 2). Het verschil is echter niet zo groot en de standaardafwijkingen overlappen elkaar. Hieruit kan dus niet besloten worden dat er een significant verschil is tussen beide stalen en dus ook niet tussen een incubatietijd van 1 uur of een incubatietijd van 3 uur. Wanneer echter het EDC-positief staal (staal 2) en het EDC-negatief staal (staal 3) met elkaar vergeleken worden is een duidelijk verschil zichtbaar. De standaardafwijkingen overlappen elkaar niet dus het verschil in gemiddelde fluorescentie is significant. Hieruit kan besloten worden dat het gebruik van EDC een effectieve manier is voor de aanhechting van DNA aan vetzuren. Het is zelfs zo dat de fluorescentie van het EDC-negatieve staal niet zo veel verschilt van de fluorescentie van het blanco staal. Dit wil zeggen dat er maar een heel kleine hoeveelheid DNA is aangehecht aan het EDC-negatieve staal en dat een deel van de fluorescentie afkomstig is van weerkaatsing of achtergrondsignaal.



Figuur 18: Staafdiagram van de bekomen gemiddelde fluorescentiewaarden door middel van ImageJ. De resultaten zijn voorzien van standaardafwijkingen

3.4 Hybridisatie- en denaturatie-experimenten met verschillen in temperatuur en vergelijking tussen EDC-negatieve en EDC-positieve stalen

Tijdens de stage zijn experimenten gedaan waarbij zowel EDC-positieve als EDC-negatieve CNW stalen gefunctionaliseerd zijn met enkelstrengig probe DNA waaraan complementair DNA wordt gehybridiseerd. Voor deze hybridisatie is gebruik gemaakt van DNA dat fluorescent gelabeld is met Alexa 488. Als hybridisatietemperatuur wordt 40°C of 60°C genomen om zo het effect van de temperatuur te bepalen. Na zowel hybridisatie als denaturatie worden van elk staal foto's gemaakt met de fluorescentiemicroscoop (Figuur 19 en Figuur 20).



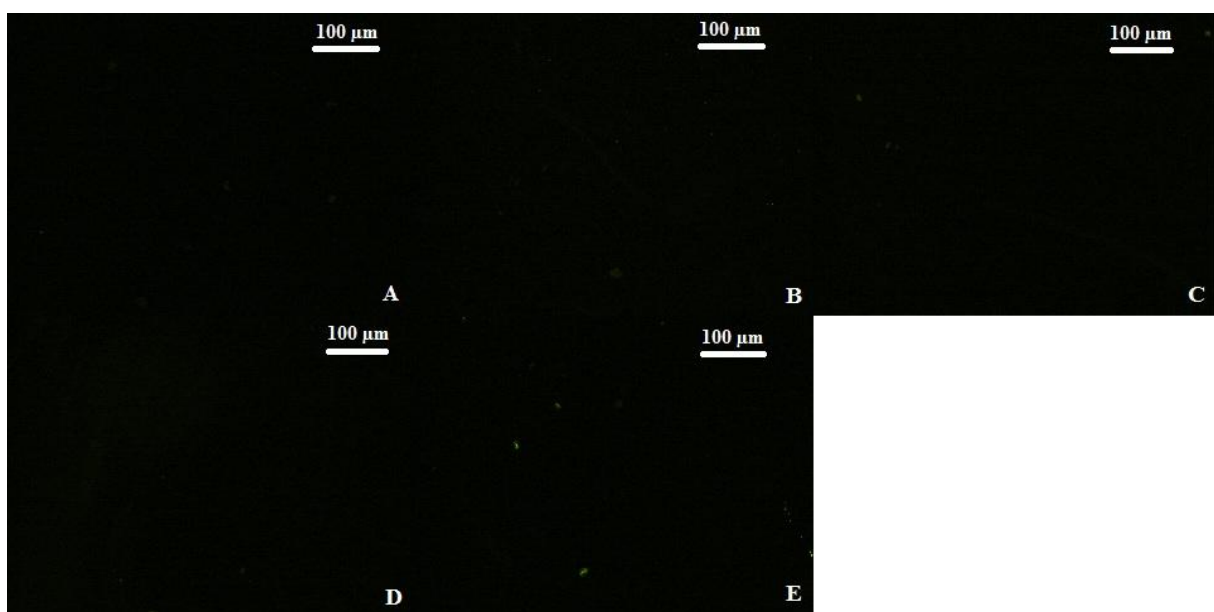
Figuur 19: Afbeeldingen van de verschillende stalen na hybridisatie. Afbeelding A is een afbeelding van het staal dat EDC-negatief is met een hybridisatietemperatuur van 40°C. Foto B en C zijn beiden foto's van twee verschillende stalen die EDC-positief zijn en een hybridisatietemperatuur van 40°C hebben gehad. Foto D en E zijn afbeeldingen van twee verschillende stalen die beiden EDC-positief zijn en waarbij een hybridisatietemperatuur van 60°C is gebruikt

De foto's die genomen zijn na de hybridisatie-experimenten geven een duidelijk verschil weer in fluorescentie tussen het EDC-negatieve staal (foto A) en de EDC-positieve stalen (foto B en C). Deze drie stalen zijn gehybridiseerd met complementair DNA bij een temperatuur van 40°C. Op Figuur 19 is zichtbaar dat het EDC-negatieve staal minder fluorescentie vertoont dan de twee EDC-positieve stalen. Dit wil zeggen dat er minder fluorescent gelabeld DNA aanwezig is op het eerste staal ten opzichte van de twee andere stalen. Het feit dat de EDC-positieve stalen wel fluoresceren bewijst echter dat er geen fout kan opgetreden zijn bij de hybridisatie zelf daar voor de drie stalen hetzelfde hybridisatieprotocol is gebruikt. Dit heeft als gevolg dat er dus enkel verschil kan zijn in de hoeveelheid probe DNA, aanwezig op het oppervlak, waaraan het complementair DNA kan hybridiseren. Dit bevestigt de resultaten van 3.3 waaruit besloten werd dat EDC een goede linker is voor het bevestigen van het probe DNA aan een oppervlak waar vetzuren zijn aangehecht. Hieruit blijkt ook dat het gebonden DNA zijn biologische activiteit behoudt vermits het nog gehybridiseerd kan worden.

Een volgend doel van het experiment is het verschil aantonen tussen verschillende hybridisatietemperaturen. Hiervoor dient gekeken te worden naar de foto's B en C en de foto's D en E. Afbeelding D en E zijn afbeeldingen van stalen waarbij de hybridisatie

gebeurde bij een temperatuur van 60°C. Op de foto's is te zien dat de stalen met een hybridisatietemperatuur van 40°C een beetje meer fluoresceren dan de stalen met een hogere hybridisatietemperatuur. Het verschil is echter niet duidelijk dus echte conclusies kunnen er niet getrokken worden uit enkel Figuur 19. Hiervoor is verwerking van de resultaten met ImageJ nodig.

Voor de denaturatie-experimenten (Figuur 20) is gebruik gemaakt van dezelfde stalen als bij de hybridisatie-experimenten om vergelijking mogelijk te maken.



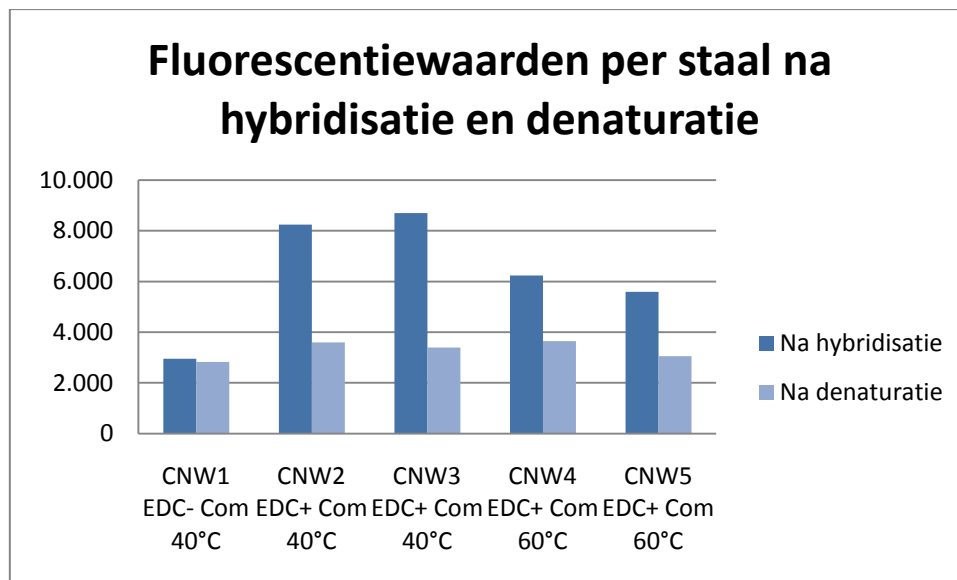
Figuur 20: Foto's genomen met de fluorescentiemicroscopie van verschillende stalen na denaturatie-experimenten.

Foto A is van het EDC-negatieve staal met een hybridisatietemperatuur van 40°C. Afbeelding B en C zijn afbeeldingen van twee verschillende stalen die EDC-positief zijn met een zelfde hybridisatietemperatuur als het staal van foto A. Foto D en E zijn foto's van stalen die ook EDC-positief zijn maar die gehybridiseerd zijn onder een temperatuur van 60°C

Alle foto's van de verschillende stalen zijn donker wat wil zeggen dat heel weinig fluorescent gelabeld DNA aanwezig is. Er is ook geen verschil te zien tussen de stalen die EDC-positief of EDC-negatief zijn of tussen de stalen met verschillende hybridisatietemperaturen. Het complementair DNA dat bij de hybridisatie-experimenten voor de fluorescentie zorgde is dus in veel mindere mate aanwezig na de denaturatie-experimenten. Dit heeft als gevolg dat het signaal dat zichtbaar is in Figuur 19 afkomstig is van fluorescent gelabeld DNA dat vastzit

aan het enkelstrengig probe DNA. Het complementair DNA is dus niet geadsorbeerd aan het oppervlak want anders zou er na denaturatie nog steeds veel fluorescentie te zien zijn.

Omdat het onmogelijk is om besluiten te trekken uit afbeeldingen wordt gebruik gemaakt van ImageJ om een gemiddelde fluorescentiewaarde van elk staal te bekomen (Figuur 21).



Figuur 21 De gemiddelde fluorescentiewaarden van de verschillende stalen na hybridisatie en na denaturatie. De waarden zijn bekomen met behulp van ImageJ en zijn afkomstig van de afbeeldingen uit Figuur 19 en Figuur 20

Zoals zichtbaar was in Figuur 19 is er een duidelijk verschil in fluorescentie tussen het EDC-negatieve staal en de EDC-positieve stalen met dezelfde hybridisatietemperatuur. De gemiddelde fluorescentiewaarden van de EDC-positieve stalen zijn zelfs bijna drie maal hoger dan het EDC-negatieve staal na hybridisatie, wat een significant verschil is.

Op de foto's van Figuur 19 was een heel klein verschil zichtbaar tussen de stalen met een hybridisatietemperatuur van 40°C en deze met een hybridisatietemperatuur van 60°C. Uit de afbeeldingen alleen kon dus geen echt besluit getrokken worden. Na resultatenverwerking met ImageJ is echter een groter verschil waar te nemen tussen beide hybridisatieomstandigheden. De gemiddelde fluorescentiewaarden van de stalen met een hogere hybridisatietemperatuur liggen ongeveer 1400 eenheden lager dan deze van de stalen met lagere hybridisatietemperatuur. Dit wil zeggen dat er minder complementair DNA aanwezig is op de stalen met een hogere hybridisatietemperatuur. Een hogere hybridisatietemperatuur is dus

minder goed voor de aanhechting van het complementair DNA aan het probe DNA. Een verklaring hiervoor is dat een temperatuur van 60°C dichterbij de smelttemperatuur van DNA dan 40°C. De smelttemperatuur van DNA is de temperatuur waarbij de dubbele helix spontaan uit elkaar gaat doordat bindingen tussen de basen breken (denaturatie). Deze temperatuur is afhankelijk van verschillende factoren waarvan de lengte van de DNA-streng en de hoeveelheid CG-bindingen ten opzichte van AT-bindingen er enkele van zijn.

Een doel van deze experimenten was te onderzoeken of er een verschil in fluorescentie zichtbaar is na hybridisatie en na denaturatie bij de verschillende stalen. Wanneer gekeken wordt naar het EDC-negatieve staal is er een minimaal verschil zichtbaar in de fluorescentie na hybridisatie en deze na denaturatie. Dit wil zeggen dat er evenveel gelabeld DNA aan het oppervlak aangehecht is na denaturatie als na hybridisatie. Dit komt doordat er geen EDC gebruikt is bij dit staal voor de aanhechting van DNA aan het oppervlak met vetzuren. Het signaal dat opgevangen wordt is afkomstig van ruis en eventueel wat geadsorbeerd DNA. De resultaten van de andere stalen na denaturatie vertonen ongeveer even veel fluorescentie als het EDC-negatieve staal na denaturatie. Ook deze fluorescentie is te wijten aan ruis en er is dus geen extra gelabeld DNA aanwezig bij de EDC-positieve stalen.

De EDC-positieve stalen met een hybridisatietemperatuur van 40°C vertonen een daling van de fluorescentie na denaturatie ten opzichte van de fluorescentie na hybridisatie. Dit wil zeggen dat de denaturatie effectief gelabeld DNA heeft verwijderd van het staal. De fluorescentie na hybridisatie is dus te wijten aan gelabeld DNA dat gehybridiseerd is en niet aan geadsorbeerd gelabeld DNA. Dit is een positief resultaat daar het te detecteren DNA selectief aan het probe DNA bindt en achteraf weer kan verwijderd worden wat het een herbruikbare “sensor” maakt.

Bij de stalen met een hogere hybridisatietemperatuur is een kleiner verschil zichtbaar. Ook hier is de fluorescentie na hybridisatie afkomstig van ruis. Uit deze resultaten kan besloten worden dat een temperatuur van 40°C beter is dan een temperatuur van 60°C voor de hybridisatie van DNA. Een volgende besluit is dat het gebruik van EDC een voorwaarde is voor de aanhechting van het probe DNA aan het oppervlak. Tenslotte kan geconcludeerd worden dat een denaturatiestap ervoor zorgt dat de fluorescentie en dus ook de aanwezigheid van het complementair DNA tot een minimum wordt beperkt waardoor de “sensor” achteraf opnieuw kan gebruikt worden voor de detectie van complementair DNA.

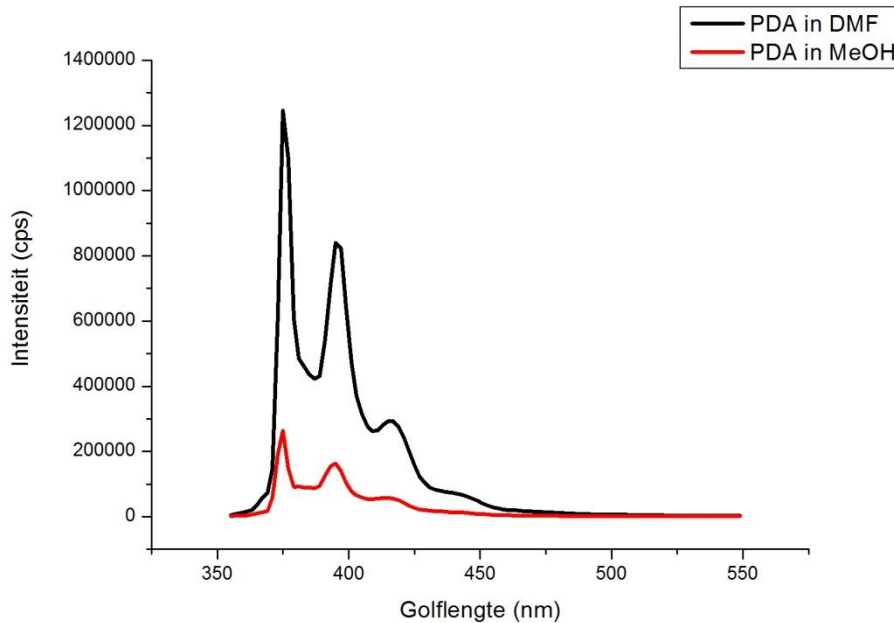
Bijkomende experimenten met 1 MM DNA

Tijdens de stage zijn bijkomende experimenten gedaan waarbij de hybridisatie met 1 mismatch (1 MM) DNA plaatsvond. Dit is DNA dat een base verschilt met het complementair DNA. Verwacht werd dat beelden van de stalen die gehybridiseerd werden met 1 MM DNA minder fluorescentie vertonen dan beelden van stalen die gehybridiseerd zijn met complementair DNA. Dit was echter niet het geval dus zijn de resultaten niet geïmplementeerd in deze thesis.

3.5 Aanhechting van PDA aan flakes

Dit deel van de stage is een nieuwe benadering voor de functionalisatie van grafeen*flakes*. Hierbij wordt getracht om PDA-moleculen te hechten aan grafeen*flakes*. PDA is een fluorescent molecule en detectie gebeurt met fluorescentiespectroscopie.

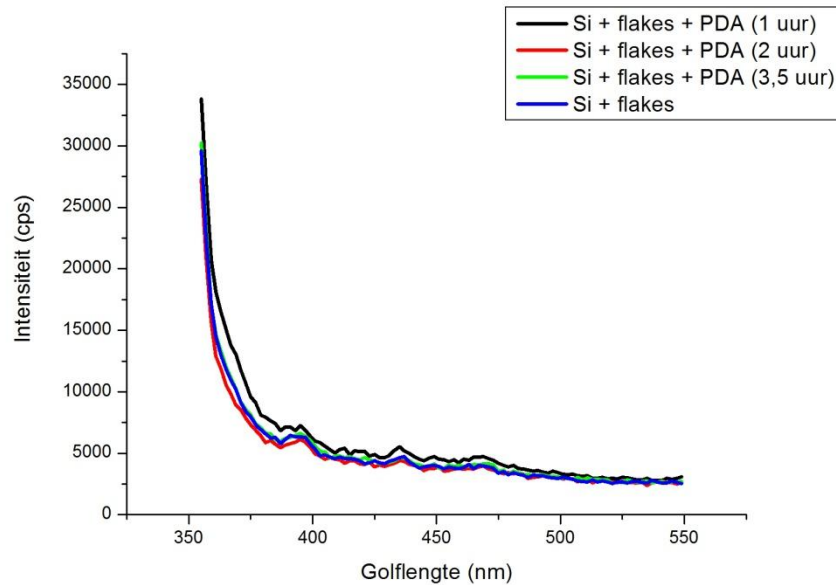
Tijdens dit experiment worden twee verschillende stalen gebruikt. Enerzijds worden *flakes* afgezet op siliciumstalen door middel van de tapemethode. Anderzijds wordt dezelfde tape gebruikt als oppervlak. Zo worden er ook verschillende solventen gebruikt bij de PDA-experimenten. Bij de siliciumstalen wordt gebruik gemaakt van PDA in DMF. De tape lost echter op in DMF waardoor voor deze stalen PDA in methanol gebruikt wordt (2.4). Om het emissiespectrum van PDA te bepalen worden spectra genomen van de PDA-oplossingen in zowel DMF als in methanol (Figuur 22). Emissiespectra werden genomen bij een excitatiegolflengte van 340 nm.



Figuur 22: Emissiespectrum van PDA-oplossingen in DMF en methanol

Uit de spectra blijkt dat PDA emissiepieken vertoont bij golflengtes van 376 nm en 396 nm. Rond 415 nm is ook een klein piekje zichtbaar. Deze pieken zijn emissiepieken wat wil zeggen dat het PDA fotonen heeft geabsorbeerd om er vervolgens terug uit te zenden met een golflengte van 376 nm en 396 nm. Het kleine piekje is niet zo van belang dus bij de volgende resultaten wordt vooral gekeken naar de grote pieken bij 376 en 396 nm voor de bepaling van de aanwezigheid van PDA. De pieken van PDA in DMF zijn hoger dan deze van PDA in methanol. Dit komt doordat de concentratie PDA in DMF 5 mM bedraagt en de concentratie PDA in methanol slechts 1 mM.

Zoals eerder gezegd is het experiment gedaan op verschillende soorten stalen. De eerste soort zijn siliciumstalen bedekt met *flakes* waaraan PDA-oplossing wordt toegevoegd (Figuur 23). Deze stalen worden gebruikt om het effect van de incubatietijd te onderzoeken.



Figuur 23: Het emissiespectrum van de siliciumstalen bedekt met flakes. Een van de stalen is een blanco staal waarop geen PDA is toegevoegd, aan de andere drie stalen is wel PDA toegevoegd gedurende respectievelijk 1, 2 en 3 uur

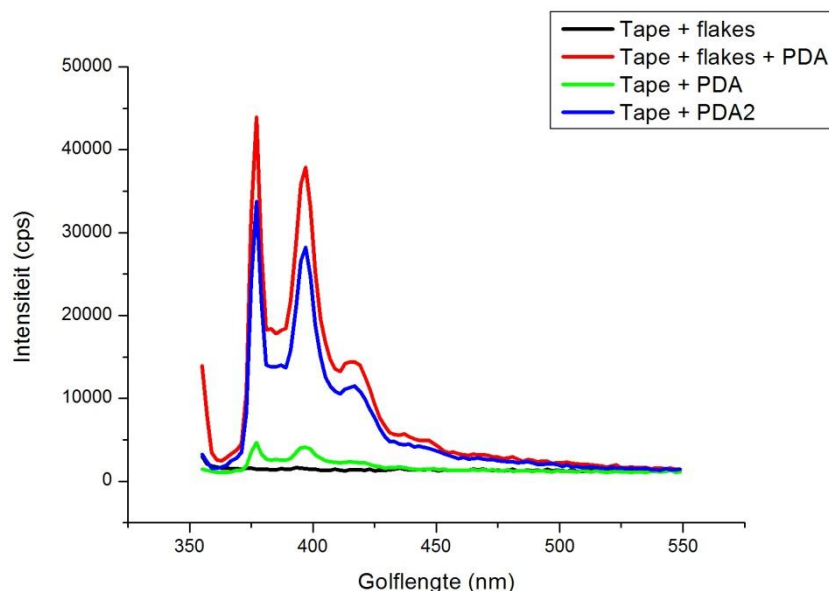
Wanneer gekeken wordt naar de resultaten van de verschillende stalen is er niet echt een effect waar te nemen. Er is bij elk staal een lichte piek waar te nemen bij 395 nm, een bij 435 nm en een heel kleine bij 445 nm. De twee laatste pieken zijn echter niet van belang bij dit experiment waar specifiek naar PDA wordt gekeken. Bij alle stalen is de piek bij 395 nm aanwezig, zo ook bij het blanco staal. Er is echter geen significant verschil tussen de PDA-positieve stalen en het blanco staal waar geen PDA aanwezig is. Hier zijn twee mogelijke verklaringen voor. Een eerste verklaring is dat er ongeveer evenveel PDA aanwezig zou zijn bij het blanco staal als bij de PDA-positieve stalen. Daar er geen PDA aan het blanco staal is toegevoegd kan er besloten worden dat er bijna geen PDA gehecht is aan de flakes van de positieve stalen. De tweede mogelijke verklaring houdt in dat de pieken die waargenomen worden afkomstig zijn van de flakes op de stalen en niet zozeer van de PDA-moleculen.

Er zijn twee mogelijke verklaringen voor dit resultaat. Een eerste verklaring is dat het bedekkingspercentage van de flakes op het siliciumsubstraat veel te laag is. Dit heeft als gevolg dat er maar een weinig PDA-moleculen aanwezig kunnen zijn. Het signaal dat uitgezonden wordt door deze PDA-moleculen zal dus relatief gezien te klein zijn om gedetecteerd te worden als fluorescentie.

De tweede mogelijke verklaring is het effect van de binding van PDA aan de *flakes*. Dit gebeurt door middel van een $\pi\pi$ -interactie tussen de aromatische ringen van het PDA-molecule en de *flake*. Deze interactie kan ervoor zorgen dat de fluorescentie uitgedoofd wordt, doordat de elektronische structuur van de aromaten gewijzigd wordt.

Dit zijn veronderstellingen en dienen dus nog verder onderzocht te worden.

De tweede soort stalen bestaat uit stukjes tape waarop zich *flakes* bevinden (Figuur 24). Er is een blanco staal waar geen PDA-oplossing aan het staal is toegevoegd. Een tweede staal is bedekt met *flakes* en werd gedurende 3,5 uur geïncubeerd met PDA-oplossing, ook het derde staal is geïncubeerd met PDA-oplossing maar dit is een blanco stuk tape waarop geen *flakes* zitten.



Figuur 24: Emissiespectrum van de tape-stalen. Er zijn drie verschillende stalen waarvan het eerste staal enkel *flakes* bevat, het tweede staal bevat *flakes* waarbij een PDA-oplossing is toegevoegd. Het laatste staal bevat geen *flakes* maar er werd geïncubeerd met PDA-oplossing. Van dit laatste staal zijn twee resultaten beschikbaar daar er op twee verschillende plaatsen van het staal gemeten wordt

Bij dit experiment zijn de pieken meer uitgesproken dan bij het experiment met de siliciumstalen. Het blanco staal waaraan geen PDA-oplossing is toegevoegd vertoont geen pieken bij 375 of 395 nm. Dit betekent dat er geen PDA aanwezig is op het oppervlak. Het *flakes*- en PDA-positieve staal vertoont wel de drie pieken die ook zichtbaar zijn in Figuur 22 wat erop wijst dat er zich PDA op het tapeoppervlak bevindt. Op het derde staal zijn twee

metingen verricht, beiden op een verschillende plaats op het staal. Tussen deze twee metingen is een opmerkelijk verschil zichtbaar waarbij de ene meting pieken vertoont die bijna even hoog zijn als deze van het volledig positieve staal. De andere meting heeft eerder pieken die maar net boven het spectrum van het blanco staal uitsteken.

Wanneer de resultaten van de siliciumstalen met de resultaten van de tapestalen met elkaar vergeleken worden kon besloten worden dat tapestalen beter zijn voor de aanhechting van PDA. Het is zo dat op de tapestalen meer flakes aanwezig zijn dan op de siliciumstalen maar zelfs dan zouden er pieken zichtbaar moeten zijn bij de siliciumstalen. Een mogelijke verklaring is dat de PDA-moleculen op de tapestalen gedeeltelijk door middel van $\pi\pi$ -interacties aan de *flakes* zijn gehecht, en gedeeltelijk aan de tape blijven plakken. Dit komt overeen met verklaring dat de siliciumstalen geen pieken vertonen doordat de structuurverandering van de aromatische ringen een verandering van fluorescente eigenschappen tot gevolg heeft. De fluorescentie die aanwezig is bij de tapestalen kan dus het resultaat zijn van de PDA-moleculen die aan de tape blijven plakken en niet van degenen die aan de *flakes* hechten.

Het verschil tussen beide metingen op eenzelfde tapestaal is mogelijk te wijten aan toeval. De eerste fluorescentiemeting kan gebeurd zijn op een plaats waar weinig *flakes* aanwezig waren waarbij de PDA-moleculen aan de tape blijven plakken en dus geen structuurverandering hebben ondergaan. De tweede meting zal daarentegen op een positie op het staal gebeurd zijn waar er wel veel *flakes* aanwezig waren en dus het overgrote deel van de gemeten PDA-moleculen hun fluorescente eigenschappen verloren hebben.

Dit zijn echter veronderstellingen en verder onderzoek is nodig om conclusies te kunnen trekken.

4 Conclusies en synthese

Grafeen kan op verschillende manieren op een substraat aangebracht worden. Wanneer gebruik gemaakt wordt van *dipcoaten* van het staal in een HOPG-oplossing kan wijziging van de soneringstijd interessant zijn. Deze is afhankelijk van de gewenste grootte en het gewenste aantal van de flakes. Ook door middel van de tape-methode kunnen verschillende grootte-orde en aantallen van flakes worden verkregen. Hiervoor dient de hoeveelheid HOPG en het aantal maal dichtvouwen worden aangepast.

Aan de hand van de resultaten uit de thesis kan besloten worden dat EDC een goede katalysator is met betrekking tot de aanhechting van DNA aan een grafeen-gebaseerd oppervlak. Voordat EDC kan gebruikt worden dienen vetzuren aangehecht te worden wat effectief kan gedaan worden door middel van UV-belichting. Bewijs voor de aanwezigheid van de vetzuren op het oppervlak kan verkregen worden met contacthoekmetingen. Wanneer gebruik gemaakt wordt van EDC zal het DNA aan het oppervlak gebonden zijn met covalente bindingen wat maakt dat het stevig aan de grafeenachtige structuur gehecht is.

De detectie van complementair DNA is reversibel daar de stalen gedenameerd en gerehybriseerd kunnen worden. Dit maakt dat de sensor herbruikbaar is voor de detectie van complementair DNA.

De experimenten naar de aanhechting van PDA aan een Si-oppervlak dat bedekt is met *flakes* vertonen weinig verschil tussen verschillende incubatietijden. Ook uit de vergelijking van de blanco stalen en het positief staal met zowel flakes als PDA kan niets besloten worden. Dit maakt dat er meer onderzoek gedaan moet worden naar het verkrijgen van een oppervlak dat volledig bedekt is met grafeen*flakes*. Ook dient zoekwerk gedaan te worden naar de effecten van de $\pi\pi$ -interactie op de fluorescentie-eigenschappen van PDA. Als derde is het aan te raden dat er gezocht wordt naar een andere detectiemethode.

Het is dus zo dat grafeen-gebaseerde oppervlakken kunnen gebruikt worden voor de aanmaak van een DNA-sensor. In deze thesis is echter enkel gefocust op fluorescentiemetingen voor de detectie van het DNA. Verder onderzoek dient dus gedaan te worden naar andere vormen van detectie van de aanwezigheid van complementair DNA. Een voorbeeld is de elektrische uitlezing van een grafeen*flake* waarop DNA is gehecht. Doordat grafeen bepaalde elektrische

eigenschappen heeft kan het nuttig zijn onderzoek te doen naar de mogelijkheid om een weerstandsverandering van het oppervlak waar te nemen na DNA-hybridisatie

Zoals eerder gezegd is het EDC-protocol een betrouwbare methode voor de aanhechting van DNA aan het oppervlak. Voor gebruik in biosensoren is het misschien een omslachtige methode daar er 20 uur belichting met UV-licht nodig is voor de aanhechting van vetzuren. Dit is niet ideaal indien er een grote hoeveelheid biosensoren moeten gemaakt worden. Verder onderzoek in de toekomst kan zich richten op snellere en gemakkelijkere methodes die even betrouwbaar zijn als de EDC-methode. PDA kan hiervoor mogelijk een oplossing bieden.

5 Referenties

1. Higgins B, Weetall H. Biosensors: an introduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1998 Apr 1;73(1):79-80.
2. *Biotechnology and Environment, Use of Biosensors to detect environmental pollutants* [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: http://www.biotechnology4u.com/biotechnology_environment_use_biosensors_detect_environmental_pollutants.html
3. Yoo E, Lee S. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*. 2010 5;10(5):4558-4576.
4. *Zwangerschapstests* [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: <http://babyplaza.be/worden/docs/index.php?story=wo009>
5. *Pregnancy Tests: Home Pregnancy Test vs. Doctor's Pregnancy Test* [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: http://www.epigee.org/pregnancy/pregnancy_tests.html
6. Geim AK, Kim P. Carbon wonderland. *Sci. Am.* 2008 Apr;298(4):90-97.
7. Katsnelson MI. Graphene: carbon in two dimensions. *Materials Today*. Jan;10(1-2):20-27.
8. Geim AK, Novoselov KS. The rise of graphene. *Nat Mater*. 2007 Maart;6(3):183-191.
9. 800px-graphene_crystall.png (PNG-afbeelding, 800x485 pixels) - Geschaald (51%) [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: http://torcuil.files.wordpress.com/2008/03/800px-graphene_crystall.png
10. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Katsnelson MI, Grigorieva IV, e.a. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature*. 2005 Nov 10;438(7065):197-200.
11. *ALSNews Vol. 277* [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: http://www.als.lbl.gov/als/als_news/news_archive/vol.277_062707.html#1
12. Kara P, Erdem A, Girousi S, Ozsoz M. Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005 Jun 1;38(1):191-195.
13. Lu C, Yang H, Zhu C, Chen X, Chen G. A Graphene Platform for Sensing Biomolecules13. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(26):4785-4787.
14. Blake P, Hill EW, Castro Neto AH, Novoselov KS, Jiang D, Yang R, e.a. Making graphene visible. *Appl. Phys. Lett.* 2007;91(6):063124.
15. Chuang AT, Boskovic BO, Robertson J. Freestanding carbon nanowalls by microwave plasma-enhanced chemical vapour deposition. *Diamond and Related Materials*.

Apr;15(4-8):1103-1106.

16. Chen RJ, Zhang Y, Wang D, Dai H. Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *Journal of the American Chemical Society*. 2001 Apr 1;123(16):3838-3839.
17. Wu Y, Qiao P, Chong T, Shen Z. Carbon Nanowalls Grown by Microwave Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition. *Advanced Materials*. 2002;14(1):64-67.
18. Malesevic A, Vitchev R, Schouteden K, Volodin A, Zhang L, Tendeloo GV, e.a. Synthesis of few-layer graphene via microwave plasma-enhanced chemical vapour deposition. *Nanotechnology*. 2008 7;19(30):305604.
19. Chuang ATH, Robertson J, Boskovic BO, Koziol KKK. Three-dimensional carbon nanowall structures. *Appl. Phys. Lett.* 2007;90(12):123107.
20. Hori Sekine Lab. Dept. of Electrical Engineering and Computer Science, School of Engineering Nagoya University [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: <http://www.nuee.nagoya-u.ac.jp/labs/horilab/eng/top.html>
21. Vansweevelt R, Malesevic A, Van Gompel M, Vanhulsel A, Wenmackers S, D'Haen J, e.a. Biological modification of carbon nanowalls with DNA strands and hybridization experiments with complementary and mismatched DNA. *Chemical Physics Letters*. 2010 Jan 18;485(1-3):196-201.
22. Christiaens P, Vermeeren V, Wenmackers S, Daenen M, Haenen K, Nesládek M, e.a. EDC-mediated DNA attachment to nanocrystalline CVD diamond films. *Biosens Bioelectron*. 2006 Aug 15;22(2):170-177.
23. Vermeeren V, Wenmackers S, Daenen M, Haenen K, Williams OA, Ameloot M, e.a. Topographical and functional characterization of the ssDNA probe layer generated through EDC-mediated covalent attachment to nanocrystalline diamond using fluorescence microscopy. *Langmuir*. 2008 Aug 19;24(16):9125-9134.
24. Wenmackers S, Vermeeren V, vandeVen M, Ameloot M, Bijnens N, Haenen K, e.a. Diamond-based DNA sensors: surface functionalization and read-out strategies. *physica status solidi (a)*. 2009;206(3):391-408.
25. File:EDC Structure.png - Wikipedia, the free encyclopedia [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:EDC_Structure.png
26. Marker Gene Technologies : M0274 - 1-Pyrenedecanoic acid (PDA) [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: <http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M0274>
27. Fujiwara Y, Amao Y. Novel optical oxygen sensing material: 1-pyrenedecanoic acid and perfluorodecanoic acid chemisorbed onto anodic oxidized aluminium plate. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2004 Apr 15;99(1):130-133.
28. The Fluorescence Microscope [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from:

- http://nobelprize.org/educational_games/physics/microscopes/fluorescence/index.html
29. Freere_Bulletin_1991.Vol17No3and4.pdf [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27]; Available from:
http://www.aiccm.org.au/docs/Bulletin1991/Freere_Bulletin_1991.Vol17No3and4.pdf
 30. Fluorescence microscope - Wikipedia, the free encyclopedia [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27]; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope
 31. Albani JR. Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. 1e ed. Wiley-Blackwell; 2007.
 32. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2e ed. Springer; 1999.
 33. DisplayArticleForFree.cfm [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27]; Available from:
http://www.rsc.org/delivery/_ArticleLinking/DisplayArticleForFree.cfm?doi=b514811c&JournalCode=SM
 34. Doolittle MH, Reue K. Lipase and phospholipase protocols. Humana Press; 1999.
 35. DNA_denaturation.jpg (JPEG-afbeelding, 315x400 pixels) - Geschaald (62%) [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27]; Available from:
http://3.bp.blogspot.com/_DZH2cmCoois/R3awVzyn1iI/AAAAAAAAAELM/2hiSoshvPXE/s400/DNA_denaturation.jpg
 36. exper2_10.gif (GIF-afbeelding, 625x248 pixels) [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27]; Available from: http://www.funsci.com/fun3_en/exper2/exper2_10.gif
 37. Google Afbeeldingen resultaat voor
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/14/Fluorimeter_schema.jpg/400px-Fluorimeter_schema.jpg [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27]; Available from:
http://www.google.be/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/14/Fluorimeter_schema.jpg/400px-Fluorimeter_schema.jpg&imgrefurl=http://nl.wikipedia.org/wiki/Fluorescentiespectroscopie&usq=__9-YAxqBHtqoq7bOYTANZUR92Scw=&h=213&w=400&sz=11&hl=nl&start=4&um=1&itbs=1&tbnid=INBzKfVzcYdiDM:&tbnh=66&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Dfluorescentie%2Bspectroscopie%26um%3D1%26hl%3Dnl%26client%3Dfirefox-a%26rls%3Dorg.mozilla:nl:official%26channel%3Ds%26tbs%3Disch:1

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Biologische modificatie en karakterisatie van grafeen-gebaseerde oppervlakken voor biosensor toepassingen

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-bio-elektronica en nanotechnologie**

Jaar: **2010**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Ryken, Jef

Datum: **15/06/2010**