

Hibridizacija DNA na atomski ravnom zlatu

Josip Batur
Institut za fiziku
Bijenička cesta 46, 10000 Zagreb
Mentor: dr.sc. Tomislav Vuletić

21.siječnja 2018.

Sažetak

Cilj ovog seminara bila je proizvodnja ravnih zlatnih čipova u svrhu kombiniranja dviju eksperimentalnih metoda: *quartz crystal microbalance* (dalje u tekstu kao QCM) i *atomic force microscopy* (dalje u tekstu kao AFM). Kao testni uzorak koristili smo hibridiziranu DNA. Uz dvije navedene eksperimentalne metode, koristili smo još i metodu naparavanja zlata.

Uvod

Eksperimentalne metode QCM i AFM nalaze široku primjenu u znanosti [1] [2]. QCM daje globalnu sliku o sistemu, govori o njegovoj masi i viskoelastičnim svojstvima, dok AFM daje lokalnu sliku i bolji uvid u promatrani sustav, pa je pokretački motiv ovog seminara kombiniranje tih dviju metoda. Osnovni preduvjet koji smo htjeli ostvariti su atomski ravni zlatni čipovi.

Konkretno, naš rad se sastojao od nekoliko koraka. Prvo, zlato je naparavano na silicijske wafere u *Metal deposition chamber* uređaju. Potom smo tako naparene wafere koristili za ravnjanje pozlaćenih kvarčnih čipova. Na izravnanje čipove adsorbirali smo i hibridizirali DNA te optimizirali postupak na QCM-u. Čipove s vezanom DNA proučavali smo na AFM-u, uspoređujući ih s prije i nakon taloženja.

U prvom dijelu seminara ukratko ću opisati tri korištene eksperimentalne metode i očekivanja koje smo imali od svake od njih. Potom ću iznijeti naše rezultate i usporediti ih s očekivanjima. Na kraju, dat ću zaključak cijelog rada i možebitna buduća razmatranja ove i srodne problematike

Eksperimentalne metode

Izrada ravnih zlatnih čipova

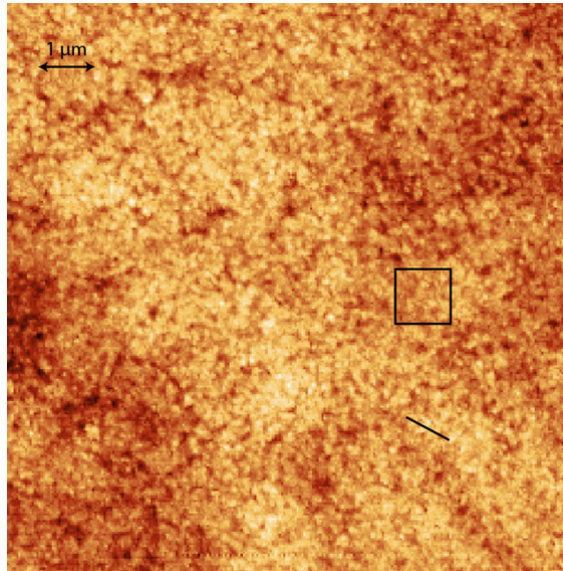
Prvo dio metode sastoji se od naparavanja zlata na silicijski wafer. Za ovaj proces korišten je *E6700 Bench Top Vacuum* (slika 1). Evaporator čini stakleno zvono koje prekriva konstrukciju za wolframovu košaricu, u koju stavljamo listiće zlata koje naparavamo na wafer.



Slika 1. Mjerni postav za naparavanje zlata

Košarica je zapravo komad spiralne žice kojom u uvjetim visokog vakuuma (cca. 10^{-5} mbara) puštamo struju. Vakuum je bitan kako bismo otklonili necistoće iz okoline i omogućili homogeno naparavanje, a postiže se uz pomoć turbomolekularne pumpe. Struja se potom polagano pušta kroz košaricu u kojoj se nalazi zlato, koje se tako grije i isparava u okolinu, taložeći se, između ostalog, na silicijski wafer kojeg smo stavili na podlogu ispod košarice. Proces se zaustavlja nakon željene količine naparenog zlata.

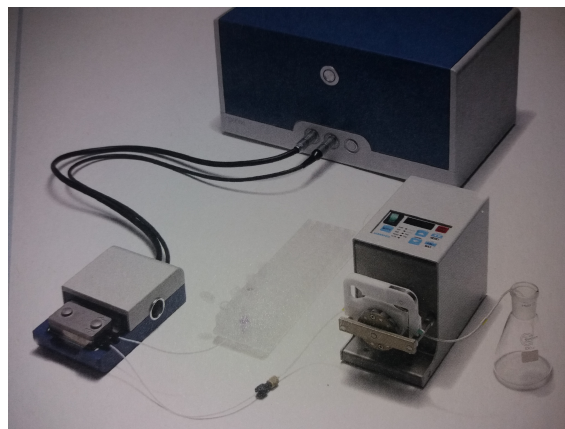
Tako naparene silicijske wafere dovodimo u kontakt sa kvarcnim čipovima (na kojima je već napareno neravno zlato) i mehanički pritišćemo. Nakon tog procesa očekujemo atomski ravno zlato na kvarcnim čipovima.



Slika 2. Atomski ravno zlato snimljeno na AFM-u. RMS = 290.6 pm Izvor : [8]

QCM

QCM metoda temelji se na piezoelektričnim svojstvima kvarca [3][4][5]. Kvarcni čip umetnut je u dio sklopa koji nazivamo kućište. Kada na kvarcni kristal primjenimo izmjeničnu struju, on se sukladno tome rasteže i kontrahira odašiljući pritom akustične valove. Akustični valovi su potom pretvoreni u električni signal, koji iz analizatora odlazi u računalo gdje je daljnje obrađen uz pomoć programa *QSoft*. Na kvarcni čip mogu se dovesti raznorazne otopine uz pomoć pumpe čiju smo brzinu stavili na $50 \mu\text{L/s}$ *QFM 401*



Slika 3. Q-Sense E1 postav za QCM. Na slici vidimo pumpu QFM 401, kućište QCP 101 i analizator QE 401

Program kao output plotu graf vremenske ovisnosti i frekvencije titranja kvarcnog čipa. Iz promjene frekvencije može se isčitati kolika masa pritišće kvarcni čip u određenom trenutku uz pomoć Sauerbery relacije [4]:

$$\delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\delta m \quad (1)$$

gdje je f_0 rezonantna frekvencija čipa, A površina čipa, ρ_q gustoća čipa, a μ_q njegov modul elastičnosti.

Međutim, kako je za valjanost Sauerbery relacije nužno zadovoljiti uvjete rigidnosti mase koja se vezala za čip i vakuumske okoline, ova relacija je modificirana tako da su pritom uzeti u obzir viskoelastični efekti. Konačno, promjena frekvencije od $\delta f = 1\text{Hz}$, odgovara deponiranoj gustoći mase od $\frac{\delta m}{A} = 17.7\text{ ng/cm}^2$ [4]

Iz tog odnosa, možemo dobiti kolika je masa adsorbirana na samom kraju procesa, iz čega možemo odrediti koliko slojeva se nataložilo na čipu. To možemo saznati koristeći najprije poznatu kemijsku relaciju :

$$\frac{m}{M_a} = \frac{N}{N_a} \quad (2)$$

gdje je m ukupna deponirana masa DNA, M_a molekularna masa DNA ($M_a = 37584\text{ g/mol}$ [9]), N_a Avogadrova konstanta, a N broj adsorbiranih molekula. Potom, iz poznavanja površine čipa i površine DNA možemo odrediti koliko molekula DNA je potrebno za prekriti čip u jednom sloju :

$$N_0 = \frac{P_c}{P_{DNA}} \quad (3)$$

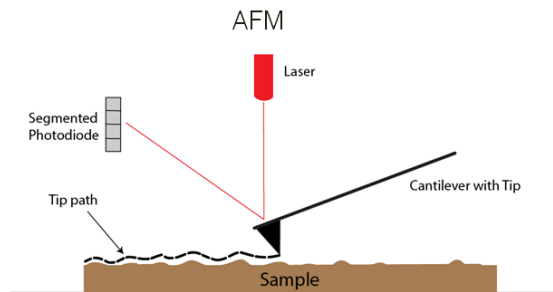
Konačno, broj slojeva na površini bit će jednak :

$$n = \frac{N}{N_0} \quad (4)$$

Važno je napomenuti kako je ovo izrazito *bruteforce* metoda ; mi smo pretpostavili da će se DNA vezivati uniformno (sloj po sloj), ali zapravo ne znamo još točno ponašanje. Ovo nam služi samo kao razumna kvalitativna pretpostavka za daljnji rad.

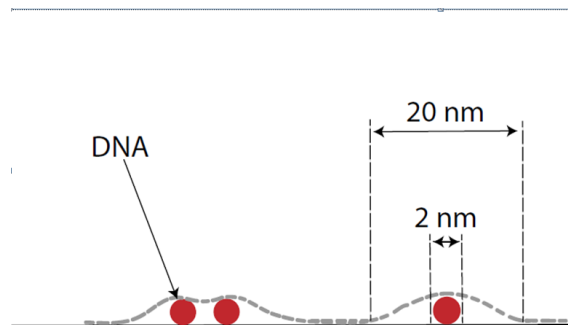
AFM

Atomic force microscopy (AFM) je visokorazlučiva grana mikroskopije koja koristi fizičku probu za skeniranje uzorka.[10] Ovom metodom mogu se dobiti slike razlučive na nanometarskoj skali. U našem radu koristili smo *contactmode* AFM-a, u kojem "igla" uređaja dodiruje površinu. Iznad igle, postavljen je laser, koji refleksijom od igle u fotodiodu mapira uzorak, koji potom vidimo na ekranu računala.



Slika 4. Shematski prikaz rada AFM-a, Izvor : [10]

Pošto je molekula koju mi proučavamo DNA, moramo uzeti konvoluciju igle sa DNA [] (slika 5.). Dakle, na AFM-u tražimo strukture širine 20 nm

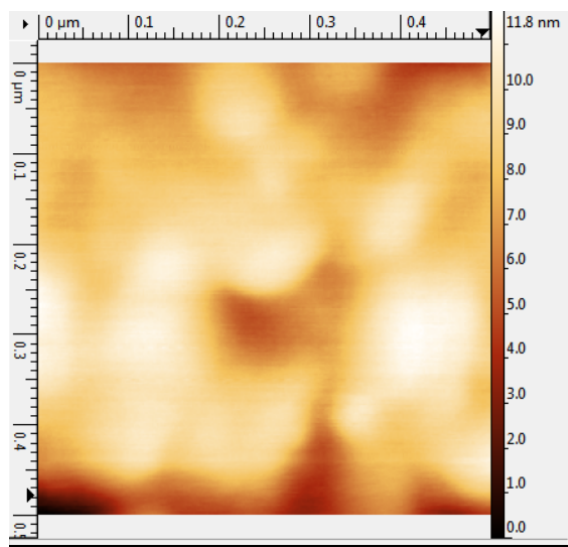


Slika 5. Zbog konačnih dimenzija igle AFM-a, treba uzeti u obzir konvoluciju vrha igle sa uzorkom. Tako, umjesto strukture od 2 nm, očekujemo vidjeti strukturu od 20 nm. [9][10]

Mjerenja i rezultati

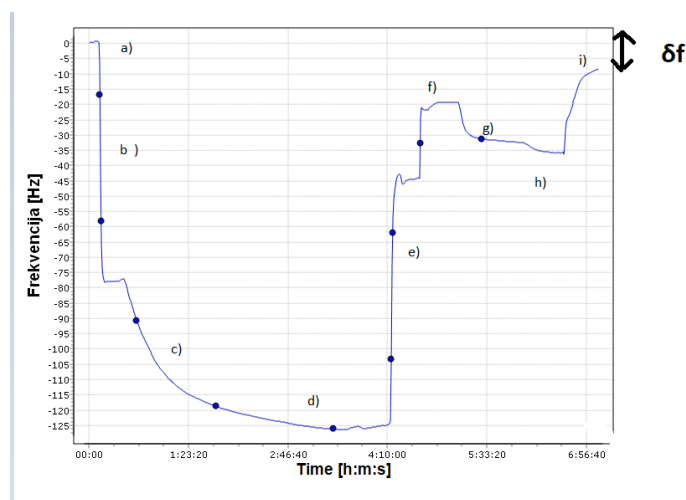
Već pri proizvodnji atomski ravnih zlatnih čipova nailazili smo na probleme. Oni su se u prvom redu ticali lošeg rada napaarivača i turbomolekularne pumpe. U prvom redu, uređaj nije držao struju konstantnom, pa samim time ni napaaravanje nije bilo jednoliko. Nadalje, tlak pod zvonom nije bio konstantan i događale su se značajne oscilacije. Na kraju, problematična je bila činjenica da smo trebali ostaviti uređaj u pogonu dok svo zlato iz košarice ne ispari, tako da nismo bili u mogućnosti dobiti tanke slojeve zlata na waferu.

Pri procesu izravnavanja zlata na kvarcnom čipu, nerijetko se događalo da čip pukne uslijed velikog pritiska ili da se zlato ne nanese ravnomjerno zbog nedovoljnog pritiska. Sve navedeno uzrokovalo je da u vremenskom roku za ovaj seminar nisam uspjeli postići željenu ravnoće zlata, već smo stalno dobijali zrnate, granulaste otiske kakve možete vidjeti na slici s AFM-a ispod :



Slika 6. Zlato na kvarcnom čipu na AFM-u. Velika razlika u kontrastu na dijelu čipa sugerira neravnomjerno nanoseno zlato.

Unatoč nemogućnosti da postignemo ravno zlato, nastavili smo s eksperimentom, želeći makar pokušati pronaći strukturu koja bi ukazivala na DNA. Na čip sa slike 6. adsorbirali smo i hibridizirali DNA. Koristili smo DNA koja na krajevima ima sumpor koji se dobro veže za zlato (THiC6). Metodu smo kalibrirali vremenski na način da smo na oštećene čipove provodili proces opisan podrobnije na slici 7. u različitim vremenima sve dok nismo dobili vrijeme adsorpcije za koje se na površinu čipa nataloži manje od jednog sloja DNA. To je bilo bitno zbog razlučivosti zlatne podloge od same DNA, jer bi u protivnom pod AFM-om bilo potpuno nemoguće razaznati što je DNA, a što zlato.

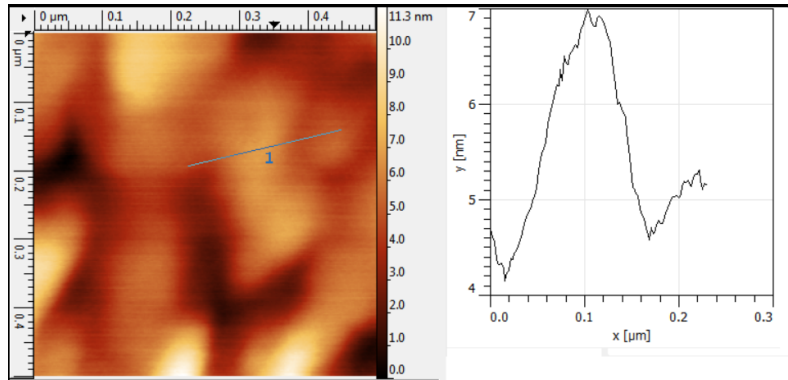


Slika 7. Graf ovisnosti frekvencije kvarcnog čipa o vremenu : a) Puštamo referentnu tekućinu na kvarcni čip sa zlatom puštamo vodu. b) Vodu mijenjamo puferom KH_2PO_4 . Primjećujemo pad frekvencije što sugerira da čip "osjeća" veći pritisak. c) Na kvarcni čip puštamo pufernu otopinu lanca DNA THiC6. Frekvencija nastavlja padati, što sugerira još veći pritisak na čip. d) Vraćamo pufer KH_2PO_4 radi stabilizacije. e) Ponovno puštamo vodu. Ona ispire sa čipa lance DNA koji se nisu vezali pa frekvencija na grafu raste. f) Stavljamo pufer PBS koji još malo ispire čip. g) Puferna otopina lanca DNA koji je komplementaran lancu THiC6. Ovi lance ne sadrže sumpor pa se

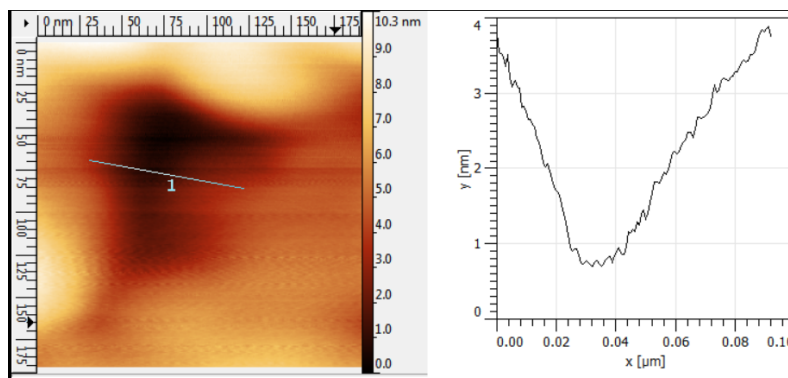
nemaju kako vezati za zlato, pa se vežu samo na DNA. h) Vraćamo PBS i) Voda kao konačna referentna točka na kojoj bilježimo ukupnu promjenu frekvencije iz koje isčitavamo koliko se DNA adsorbiralo na površinu.

Ukupna frekvencijska promjena zabilježena na gornjem grafu je $\delta f = (7 \pm 1)\text{Hz}$. Prema već opisanom računu, dobili smo da je DNA prekrila (0.3 ± 0.1) površine cijelog čipa (dakle, oko trećinu) što je vrlo zadovoljavajuć rezultat.

Takav čip stavili smo pod AFM i nažalost, nismo uočili ništa pretjerano konkluzivno. Nismo uspjeli naći strukture za koje bi bili sigurni da su hibridizirana DNA. Razlog tome su tehnički nedostaci zbog kojih nismo mogli proizvesti ravnije čipove. Međutim, ipak smo uočili neke zanimljive strukture (slike 8. i 9.) :



Slika 8. Na skali od $0.5 \mu\text{m}$ primjećujemo strukturu visine oko 7nm. Očekujemo da molekula DNA ima visinu oko 3nm [9]. Ovdje se možda radi o nekoliko lokalnih slojeva, no ne možemo biti sigurni



Slika 9. Ovdje se možda radi o udubini na dnu koje je zlato, okruženoj DNA

Zaključak

U ovom seminaru iskombinirane su tri eksperimentalne metode : Naparavanje i izravnavanje zlata na kvarcne čipove, QCM i AFM. Prvom metodom nismo uspjeli dobiti atomski ravno zlato (RMS oko 300 pm). QCM metodom uspjeli smo postići vezanje manje od jednog sloja DNA na kvarcni čip sa zlatom, međutim, istu nismo uspjeli sa sigurnošću primjetiti pod AFM-om. Razlog tome vjerojatno leži u neravnim čipovima, što će nam u budućnosti biti cilj optimizirati i poboljšati. Daljnji planovi tiču se daljnje optimizacije kombiniranja ovih tehnike te primjene na neke 2D materijale (npr. grafen), što može pomoći u razvijanju senzora. Također, u planu je kombiniranje QCM metode sa STM-om.

Literatura

[1] Manuel Kasper, Lukas Traxler, Jasmina Salopek, Herwig Grabmayr, Andreas Ebner and Ferry Kienberger, "Broadband 120 MHz Impedance Quartz Crystal Microbalance (QCM) with Calibrated Resistance and Quantitative Dissipation for Biosensing Measurements at Higher Harmonic Frequencies", Sensors, 25 May 2016

[2] Xianhe Huang, Qingsong Bai, Jianguo Hu, and Dong Hou, "A Practical Model of Quartz Crystal Microbalance in Actual Applications", Sensors, 2017 Aug 3. doi: 10.3390/s17081785

[3] Conrad J Burden, Yvonne Pittelkow¹ and Susan R Wilson, "Adsorption models of hybridization and post-hybridization behaviour on oligonucleotide microarrays", J. Phys.: Condens. Matter 18 (2006) 5545–5565 doi:10.1088/0953-8984/18/23/024

- [4] Bradshaw L. "Understanding piezoelectric quartz crystals", RF time and frequency 2000;8:50–58.
- [5] Matthew C. Dixon, "Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions", *JouRNAL oF BIOMOLECULAR TECHNIQUES*, VoLuME 19, ISSuE 3, JuLY 2008
- [6] Tonya M. Herne and Michael J. Tarlov, "Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 119, No. 38, 1997
- [7] Ang, Huabin An, Hongjie Zhang, Feng Zhang, Zhixiang Ye, Ming Xiu, Peng Zhang, Yi hu, Jun. (2008). "Study of substrate-directed ordering of long double-stranded DNA molecules on bare highly oriented pyrolytic graphite surface based on atomic force microscopy relocation imaging. *Journal of Vacuum Science Technology B Microelectronics and Nanometer Structures.*" 26. L41-L44. 10.1116/1.2968698.
- [8] Ida Delač Marion, "Hybrids of biomacromolecules and modern two-dimensional materials", University of Zagreb, Faculty of science, Department of physics, Zagreb 2017.
- [9] Bansal M (2003). "DNA structure: Revisiting the Watson-Crick double helix". *Current Science.* 85 (11): 1556–1563.
- [10] <https://www.nanoscience.com/technology/afm-technology/how-afm-works/>