

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Grafeenin ja proteiinien vuorovaikutus

Kandidaatintutkielma
23.05.2019
Dan Tolkki



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tämä kirjallisuuskatsaus pyrkii luomaan laajahkon perustepohjan grafeenimateriaaleista ja näiden funktionalisoinnista proteiineilla ja tietyillä muilla biomolekyyleillä. Erityistä huomiota on kiinnitetty erilaisten vuorovaikutusten rooleihin ja biologisiin (yhteis)vaikutuksiin. Grafeenimateriaalien ja biomolekyyleillä funktionalisoitujen grafeenimateriaalien sovelluskohteita on tarkasteltu ja näiden jatkosoveltamista spekuloitu ja ehdotettu lopputulokset- ja yhteenvetoluvussa. Lisäksi tarpeellisiksi katsottuja perustietoja kuvantamismenetelmistä, grafeenimateriaalien valmistamisesta, sekä proteiinien funktionaalisesta rakenteesta on esitelty kirjallisuuden pohjalta katsauksen seassa.

Grafeenimateriaaleihin voidaan liittää proteiineja ja muita biomolekyylejä. Puhdas grafeenipinta sitoo biomolekyylejä hydrofobisilla vuorovaikutuksilla, kun grafeenioksidipinta puolestaan sitoo biomolekyylejä koordinoivilla vuorovaikutuksilla ja kovalenttisilla sidoksilla. Nämä sitovat vuorovaikutukset myös muokkaavat liitettäviä biomolekyylejä ja mahdollisesti myös grafeenimateriaalia. Lisäksi ympäristön muutoksien kyky irrottaa ja muokata grafeenimateriaaleihin sidottuja biomolekyylejä riippuu siitä, miten biomolekyylit on kiinnitetty pintaan.

Grafeenipinnoilla on useita mahdollisia sovelluskohteita muun muassa bioteknologiassa ja teollisuudessa. Grafeenimateriaalien pintoja ja näiden funktionalisointia voidaan tutkia useilla eri tavoilla, kuten muun muassa fluoresenssilla ja mikroskopian muodoilla, kuten elektroni-, atomivoima- ja valomikroskopiolla. Näiden sovelluskohteiden mahdollisuuksien arvioimiseksi ja turvalliseksi tekemiseksi täytyy grafeenimateriaalien ja biomolekyylien väliset vuorovaikutukset tuntea tarkasti.

Esipuhe

Tämä kandidaatintutkielma on kirjoitettu keväällä 2019 Jyväskylän yliopistossa kandidaatin tutkintoa varten. Kemian laitoksen johtaja, professori Mika Pettersson toimi työn ohjaajana Jyväskylän yliopiston nanotiedekeskuksessa.

Tutkielman aihe käsittelee pääasiallisesti grafeenin ja sen johdannaisten vuorovaikutuksia proteiinien kanssa, sekä näiden vuorovaikutusten soveltamista grafeenimateriaalien ja esimerkiksi proteiinien sitomisessa toisiinsa. Aihe on äärimmäisen laaja ja poikkitieteellinen yhdistelmä solu- ja molekyylibiologiaa, kemiaa, sekä mikro- ja nanotason fysiikkaa. Tämän vuoksi aihetta pyrittiin rajaamaan pelkästään pintaraapaisuksi, mutta aiheesta kattavan ja yhtenäisen kokonaisuuden luomiseksi kirjallisuuskatsaus käy melko perusteelliseksi läpi myös hieman löyhemmin asiaan liittyviä aiheita. Proteiinin perusrakennetta ja laskostumista käydään läpi, jotta proteiinien vuorovaikutukset grafeenimateriaalien kanssa selittyisivät luontevasti. Lisäksi grafeenin ja sen johdannaisten valmistutusta ja kuvantamista on käyty läpi katsauksen tasapainottamisen nimissä. Aiheen rajauksesta huolimatta tutkielma venyi pituudeltaan, mikä toivottavasti korreloi asiasisällön määrän kanssa.

Käytetyt lähteet koottiin valtaosin käyttäen Googlen ilmaista Scholar-hakukonetta, Jyväskylän yliopiston kirjaston JYKDOK-tietokantaa ja ACS Publications:in julkaisutietokantaa. Osa käytetyistä lähteistä löydettiin myös muista lähteistä. Suurimmaksi ongelmaksi lähteiden ja viitteiden kanssa nousi käytettyjen lähteiden tapa viitata toisiinsa, mikä vaikeutti tarkkojen alkuperäislähteiden löytämistä ja näihin viittaamista. Tämä oli erityisen selvää esimerkiksi grafeenin perusominaisuuksia ja rakennetta käsiteltäessä, koska tähän liittyvät perustutkimukset ja koonnit ovat valtaosin grafeenitutkimuksen alkuajoilta, minkä vuoksi suurin osa näistä lähteistä viittaa toisiinsa, vaihtelevalla selkeydellä.

Haluaisin kiittää Mika Petterssonia ohjauksesta ja mahdollisuudesta syventyä aiheeseen. Haluaisin kiittää erityisesti myös Saara Kaskea ja Jussi Ahokasta palautteesta kandin sisällöstä ja kirjoitusasusta, sekä teknisestä avusta lähteiden kanssa. Haluaisin kiittää lisäksi kaikesta enemmän tai vähemmän rakentavasta palautteesta, jota olen saanut kemian opiskelijoiden taukotuvasta ja fysikaalisen kemian osastolle sattuneilta ~~uhreilta~~ vapaaehtoisilta. Lopuksi haluaisin kiittää vielä kaikkia muita, jotka ovat antaneet palautetta kirjoitus- ja korjausprosessin aikana.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	i
Esipuhe	ii
Sisällysluettelo	iii
1 Johdanto	1
2 Taustatietoa grafeenista	2
2.1 Grafeenin rakenne ja ominaisuudet	2
2.2 Grafeenioksidi.....	5
2.3 Grafeenin valmistus	7
3 Grafeenimateriaalien ja proteiinien yhdistäminen	11
3.1 Proteiinien rakenne ja vuorovaikutukset	12
3.2 Grafeenimateriaalien funktionalisoiminen proteiineilla	14
3.3 Grafeenimateriaalien biologiset vaikutukset ja vaikutukset proteiinien kanssa	22
4 Grafeenimateriaalien karakterisointi ja sovellukset	28
4.1 Grafeenimateriaalien ja funktionalisoitujen grafeenimateriaalien karakterisoinnista	28
4.2 Grafeenimateriaalien sovelluksista	32
5 Lopputulokset ja yhteenveto	37
Lähteet	41

1 Johdanto

Grafeeni on yksikerroksista levymäistä hiiltä, jonka voidaan ajatella muodostavan grafiittia latoutuessaan.¹⁻⁷ Nobel-palkittuja Novoselovia ja Geimiä tutkimusryhmineen pidetään ensimmäisinä, jotka onnistuivat tuottamaan aitoa yksikerroksista grafeenia vuonna 2004,^{1,8-13} vaikka muun muassa P.R. Wallacen grafiittia tutkivasta, jo vuonna 1947 ilmestyneestä, julkaisusta⁴ voidaankin huomata joitain viitteitä grafeenille kokeellisesti todetuista elektronisista ominaisuuksista. Grafeenista on olemassa myös hapettunut muoto: grafeenioksidi, jota voidaan valmistaa hapettamalla esimerkiksi grafeenin valmistuksen yhteydessä, ja tätä seuraavilla lämpökäsittelyillä muokata rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan takaisin kohti grafeenia.^{5,6,12,14-18}

Grafeenimateriaalien ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa esimerkiksi muuttamalla niiden kerrospaksuuksia: mikä muuttaa muun muassa sen valon transmissiivisyyttä ja jäykkyyttä;^{18,19} tai pintaryhmiä: grafeenioksidin happiryhmät vuorovaikuttavat ympäristön kanssa eri tavoilla kuin puhdas grafeeni ja voivat reagoida herkemmin ympäröivien aineiden kanssa.^{5,6,14,15} Samaten pintaan kiinnitetyt (mahdollisesti katalyyttiset) biomolekyylit (kuten proteiinit/entsyymit) voivat sallia grafeenimateriaaleille uusia bio-ominaisuuksia yhdistettynä kyseisten grafeenimateriaalien omiin ominaisuuksiin.^{18,20-37}

Grafeenimateriaaleista ja näiden biomolekyylikomposiiteista voidaan kehittää useita erilaisia konkreettisia sovelluksia, kuten (bio)sensoreita, sekä sähköisiä ja elektronisia komponentteja.^{14,18,24,27,35,36,38,39} Näitä biomolekyylien ja grafeenimateriaalien yhteenliittymiä koossa pitävät vuorovaikutukset voivat kuitenkin tehdä näistä myös eri tavoilla haitallisia kiinnitetyille proteiineille, ympäristölle ja jopa kokonaisille elollisille systeemeille.^{18,24-27,34,35,40} Lisäksi näiden vuorovaikutusten vahvuuksien biomolekyyli- ja sitoutumistyyppikohtaiset muutokset ympäristötekijöiden (esimerkiksi pH-arvon) muuttuessa tulee tuntea nanomateriaalien epähaluttuihin paikkoihin vuotamisen välttämiseksi.^{18,23,24,26,31,34,35,37}

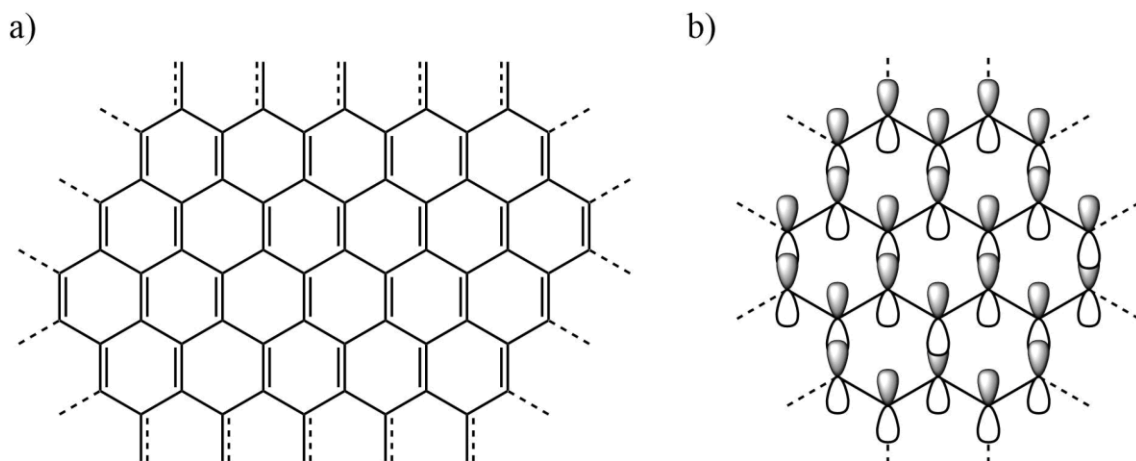
Tämä kirjallisuuskatsaus pyrkii esittelemään yleisesti grafeenin ja sen johdannaisten ominaisuuksia, sekä erilaisia vuorovaikutuksia, joilla proteiinit ja muut biomolekyylit voivat liittyä grafeenimateriaaleihin. Grafeenimateriaalien mahdollisiin vaikutuksiin elävissä soluissa ja kudoksissa on myös kiinnitetty huomiota tässä katsauksessa.

2 Taustatietoa grafeenista

Grafeeni on yksi kiinteän hiilen allotrooppinen muoto, joka koostuu yksittäisestä atomikerroksesta sp^2 -hybridisoitunutta hiiltä, vaikka joskus sillä viitataan alle 10 kerroksiseen levymäiseen rakenteeseen.^{2,5,9,11} Grafeenin voidaan täten ajatella olevan yksittäinen kerros yleisesti esiintyvää grafiittia (luonnollisesti esiintyvää hiilen allotrooppia)², joka koostuu useammasta ladotusta kerroksesta grafeenia, jotka liittyvät yhteen heikoilla van der Waals-vuorovaikutuksilla.^{6,7} Yksikerroksisen –eli aidon– grafeenin onnistuneesta eristämisestä mainittiin ensimmäisen kerran vuonna 2004 julkaistussa artikkelissa⁹, jolloin grafeenia ”kuorittiin” mekaanisesti pyrolyyttisestä grafiitista.^{1,8–12}

2.1 Grafeenin rakenne ja ominaisuudet

Grafeeni on rakenteeltaan yhden atomin paksuista hiililevyä, jossa jokainen hiili on sitoutunut kolmeen muuhun hiileen.^{1–5} Tässä molekulaarisessa rakenteessa jokaisen hiilen voidaan kuvata muodostavan kolme yksöissidosta ja yhden delokalisoituvan kaksoissidoksen, eli tässä kennomaisessa rakenteessa on kolme σ -sidosta jokaisesta hiilestä ja π -sidokset muodostavat delokalisoituneen elektroniverhon hiililevyn ylä- ja alapuolelle.^{5,14,17,41} Tämä sitoutuminen juontuu hiilen kyvystä hybridisoida elektroniorbitaaleiltaan, mikä voidaan mallintaa grafeenissa sp^2 -hybridisaationa, jossa hiilen valenssikuoren s-orbitaali ja kaksi p-orbitaalia hybridisoituvat kolmeksi matalaenergisemmäksi sp^2 -orbitaaliksi, jättäen yhden vapaan korkeaenergisen p-orbitaalin.^{5,41} Geometrisesti sp^2 -orbitaalit osoittavat vaakatasossa toisistaan poispäin ja hybridisoitumaton p-orbitaali suuntautuu kohtisuoraan grafeenin tasoa kohti.^{5,17,41} Edellä kuvailtu on nähtävillä kuvassa 1.



Kuva 1: a) Grafeenin hiilien sitoutuminen toisiinsa yksöis- ja kaksoissidoksilla. b) p-Orbitaalien suuntautuminen grafeenin rakenteessa. *Chemdraw Professional*.

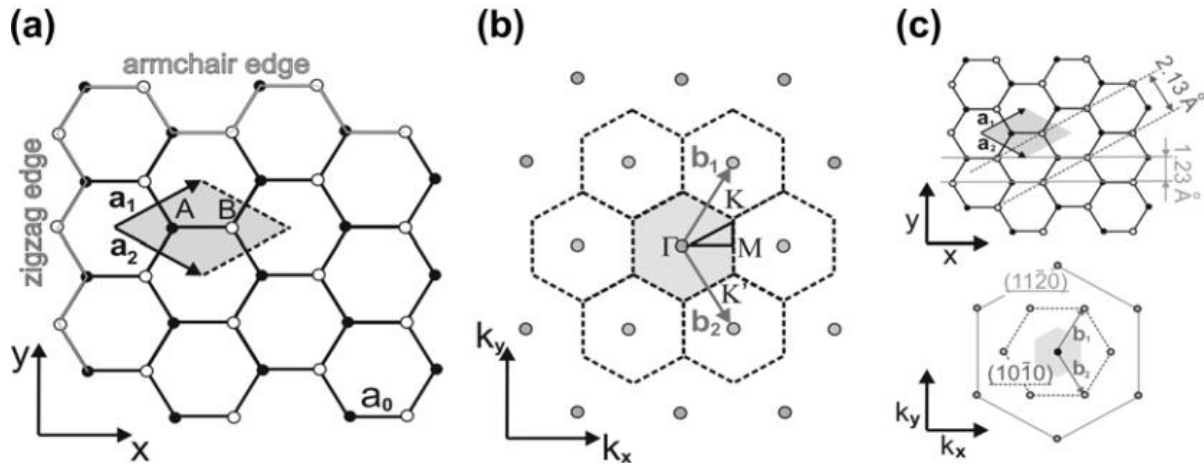
Kuvasta 1 voidaan huomata, kuinka grafeenin kaikki σ -sidokset suuntautuvat tasomaisesti levyssä, kun π -sidokset muodostavat p-orbitaalit suuntautuvat osoittamaan yhdensuuntaisesti. Tämä p-orbitaalien samansuuntaisuus johtaa π -elektronien delokalisoitumiseen.^{14,17} Koska grafeeni vuorovaikuttaa van der Waalsin voimilla,^{5,17,41} voidaan todeta, että grafeeni on hydrofobista.⁴² Grafeenin mittaluokka on itsessään vaikuttava tekijä useissa sen ominaisuuksissa: grafeenissa on painoonsa suhteutettuna paljon mahdollista pinta-alaa ($2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$),¹⁴ joka on täynnä poolittomia aromaattisia renkaita, mikä vahvistaa van der Waals- vuorovaikutuksia ja aromaattista π - π -vuorovaikutusta.^{17,42} Van der Waalsin vuorovaikutusta tehostanee lisäksi se, että grafeenin vuorovaikutuspinta-alan suuruus, verrattuna sen pieneen kokonaisuuteen, myös altistaa grafeenin kontaktivuorovaikutuksien indusoinnille.¹ Lisäksi grafeenin kiteen yksikerroksisuuden ja pienen koon ansiosta grafeenin koko pinta on näkyvillä ja täten pienetkin kemialliset muutokset ilmenevät.¹ Edellä mainitun vuoksi voidaan pitää itsestään selvänä, että grafeenin ominaisuuksia voidaan kätevästi tutkia ja seurata pintoja kuvantavilla menetelmillä, kuten atomivoimamikroskopiolla^{3,11,14,22,23,26,43-46} ja tunnelointivirtamikroskopiolla^{3,14,43}.

Grafeeni on monien ominaisuuksiensa puolesta ylivoimainen verrattuna moniin yleisesti käytettyihin materiaaleihin. Mekaanisilta ominaisuuksiltaan grafeeni on perinteistä terästä parempaa.¹ Se on samaan aikaan todella joustavaa, mutta samalla vedettäessä huomattavasti lujempaa (sen elastinen kerroin [Youngin moduuli] on teräskaliin luokkaa)⁴⁵ kuin teräs.^{1,8,45} Nämä mekaaniset ominaisuudet johtuvat edellä esitellyistä grafeenin tasomaisista σ -sidoksista.^{5,17,41} Koska nämä sidokset ovat samassa tasossa ja liittyvät jokaisen hiilen samalla tavalla kolmeen muuhun hiileen, sidokset ovat sp^2 -hybridisoituneessa grafeenissa vahvoja.^{5,17,41} Lisäksi mainittakoon, että grafeenilevyn kerrosten määrä on suoraan verrannollinen sen jäykkyyteen.¹⁸

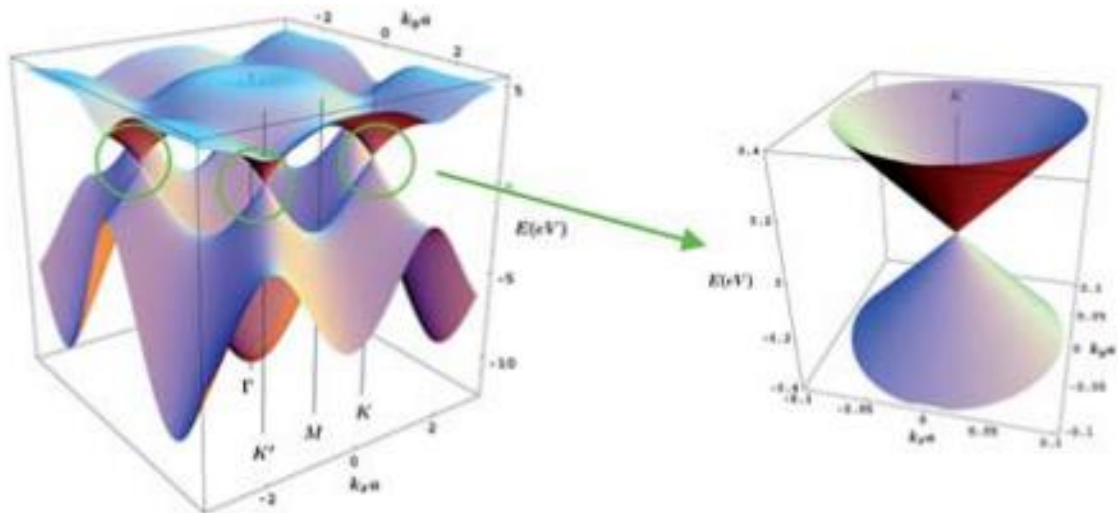
Grafeenin lämmönjohtavuus on noin $5000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.⁴⁷ Tämä korkea lämmönjohtavuus ei johdu grafeenissa delokalisoituneista π -elektroneista, vaan puhtaassa grafeenissa lämpö siirtyy grafeenin tasomaisia kemiallisia sidoksia pitkin värähdellen.¹⁷ Epäpuhtaassa kiderakenteessa tai molekulaarisesti epätäydellisessä grafeenissa tämä ei välttämättä päde.¹⁷ Itsenäinen grafeeni on myös hyvin valoa läpäisevää (noin 2,3 % valosta absorboituu) ja sen kyky estää valon läpikulua on suoraan kytköksissä siihen, kuinka monta kerrosta sitä on päällekkäin.¹⁹

Puhdas grafeeni on puolimetallina hyvin sähköä johtavaa,^{1,4,41,48,49} ja se kestää suuria sähkövirtoja (suurempia kuin $10^8 \text{ A} \cdot \text{cm}^{-2}$).⁹ Puhdasta grafeenia pidetään ”luonnollisena” *zero-gap*-puolijohteena, jossa valenssi- ja johdinvyön väliin ei jää ollenkaan kiellettyä

energiaväliä, mutta nämä elektronivyöt eivät myöskään kosketa.^{1,4,5,9,17,50} Tämän elektronivyörakenteen voidaan katsoa johtuvan grafeenin laaja-alaisesta aromaattisten π -elektronien delokalisaatiosta, jonka ajatellaan aiheuttavan grafeenin johtavuuden.^{1,17} Grafeenin valenssi- ja johdinvyöt kohtaavan pistemäisesti niin sanotuissa Diracin pisteissä, jotka sijaitsevat kuvien 2 ja 3 osoittamalla tavalla suhteessa niin sanottujen Brillouinin vyöhykkeiden kulmissa.^{1,5,17,41}



Kuva 2: Havainnollistava kuva Diracin pisteiden (K ja K') sijainnista grafeenissa. a) Grafeenin kaksiuotteinen alkeiskoppi. b) Diracin pisteiden (K ja K') sijainti Brillouinin vyöhykkeissä (katkoviivat) suhteessa hiiliatomeihin (harmaat pisteet). c) Kohdan a kuva hilatasoilla ja kohdan b kuvan Brillouinin vyöhyke merkittynä suhteessa diffraktiopisteisiin. Kuva lainattu lähteestä 5: Warner, J.H.; *et al.* toimittaman teoksen ”*Graphene: Fundamentals and Emergent Applications*” Schäffel, F.:n kirjoittamasta osasta ”*The Atomic Structure of Graphene and Its Few-layer Counterparts*”.



Kuva 3: Grafeenin valenssi- ja johtavuusvöiden fyysikaalinen kohtaaminen pistemäisesti Diracin pisteissä (K ja K'). Kuva lainattu lähteestä 1: Mas-Ballesté, R.; *et al.* julkaisusta ”*2D materials: to graphene and beyond*”.

Johtuen grafeenin elektronivöiden hienovaraisesta (pistemäisestä) kosketuksesta Diracin pisteissä, elektronivyörakenteeseen ja tästä seuraavaan johtavuuteen voidaan helposti vaikuttaa useilla eri tavoilla.^{1,17,50} Näistä ehkä tunnetuin on sähkökentälle altistaminen,⁹ mutta elektronivöiden sijainteihin toistensa suhteen voidaan vaikuttaa muun muassa magneettikentillä, substraateilla ja grafeenin muotoa muuttamalla.^{1,14,17,41,50} Esimerkiksi kuvan 3 oikealla puolella näkyvän elektronivöiden pistemäisen kosketuksen muokkaus voi johtaa ylemmän (niin sanotun Fermi-tason ylittävän) johtavuusvyön miehitykseen esimerkiksi valenssielektroneilla, jolloin johtuminen tapahtuu varauksensiirtäjäelektronien välityksellä tai (Fermi-tasosta) alemmalle valenssivyölle syntyvään elektronisesti ”tyhjään” tilaan, jonka liikkuminen saa virran kulkemaan.^{1,4,9,14,50} Tämä muuttaa (doppaa/rikastaa/seostaa) grafeenin johtavasta puolimetallista n- tai p-tyypin puolijohteeksi, kuten Bekyarova, E.; *et al.* ovat onnistuneet tekemään aryyli-ryhmiä grafeenin pintaan liittäessään.²⁹ Elektronisen vyöaukon puuttumisen voidaan myös ajatella tuottavan jatkuvan absorptiospektrin, sillä elektronit voivat vyövälän puuttuessa suorittaa elektronisesti rajoittamattoman määrän virityssiirtymiä, jolloin mahdollinen absorptiospektri tulee olemaan aukoton.¹

Grafeenin kemialliseen reaktiivisuuteen vaikuttaa sen poimuttuneisuus, joka indusoi sen muutoin vakaita sp^2 -hybridisoituneita hiiliä reagoimaan luomalla rasiitusta hiili-hiili-sidoksiin.^{1,17,51} Nämä grafeenin reaktiivisuudelle altistavat poimut luonnostaan vakauttavat grafeenia, joka ei ole kiinnitettyä pintaan.^{44,52} Grafeenin pinnan kovalenttinen funktionalisointi muuttaa hiilien sp^2 -hybridisoitumisen sp^3 -hybridisoitumiseksi, mikä lisää näiden hiilien lähialueiden reaktiivisuutta grafeenissa ja on havaittavissa grafeenin sp^3 -hybridisoituneissa reunoissa ja rakenteen virhekohtissa.^{17,51} Grafeeniin voidaan liittää kemiallisia ryhmiä kovalenttisesti myös välillisesti: hapettamalla grafeenin pintaa happiryhmiä sisältäväksi grafeenioksidiksi, jolloin molekyyliä voidaan funktionalisoida pintaan kiinnittäen näiden happiryhmien reaktioilla.^{5,17,51} Grafeenia voidaan lisäksi funktionalisoida heikoilla sidoksilla, kuten van der Waals- ja π - π -vuorovaikutuksilla, jolloin grafeenin sp^2 -hybridisaatio ei muutu ja täten elektroniset ominaisuudet eivät muutu pysyvästi.^{17,42}

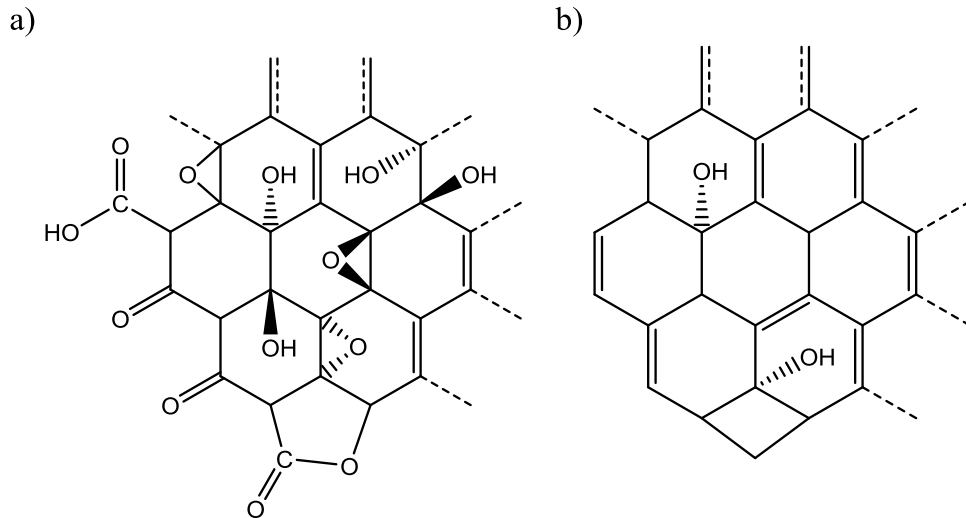
2.2 Grafeenioksidi

Grafeenioksidi on grafeenin hapettunut muoto, jota voidaan valmistaa grafiitista.^{5,6,12,14–18} Hapettunut grafeeni –grafeenioksidi – sisältää happiryhmiä, jotka riippuvat sijainnista: epoksi- ja hydroksidiryhmät hapettuvat valtaosin sp^2 -hiiliin grafeenin pinnalla, kun karbonyyli- ja karboksyyli-ryhmät puolestaan hapettuvat grafeenin sp^3 -hiiliin grafeenin reunoilla ja

virhekohtissa.^{5,6,15,17,18,51} Grafeenioksidin pinnalla on usein myös hapettumattomia alueita, jotka ovat sp^2 -hybridisoituneita ja aromaattisia.¹⁸ Happiryhmien (kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen)⁶ kiinnittyminen grafeenin pintaan muuttaa grafeenin monia rakenteesta riippuvia ominaisuuksia.^{5,6,14,15} Happiryhmät esimerkiksi tekevät grafeenin hydrofobisesta pinnasta hydrofiilisen^{5,14} ja muuttavat sen johtavuutta muokkaamalla elektronirakennetta.^{5,6,15} Grafeenin kemiallisista ominaisuuksista ja reaktiivisuudesta puhuttaessa voidaan grafeenioksidin yhteydessä mainita happiryhmien liittymisen grafeenia kemiallisille reaktioille altistavat vaikutukset: sp^2 -hybridisoituneiden hiilien muutos sp^3 -hybridisoituneiksi,¹⁵ sekä esimerkiksi epoksidi-ryhmien grafeenin pintaan liittyessään aiheuttama poimuttuminen.⁵

Grafeenioksidin grafeenista eroavia ominaisuuksia voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi grafiitin grafeenikerrosten erottelussa.^{5,6,12,15,16} Grafeenioksidia voidaan valmistaa tehokkaasti grafiittia vahvoilla hapettimilla hapettamalla grafiittioksidiksi, jonka kerrokset voidaan erottaa grafeenioksidiksi.^{5,6,12,14–16,18} Grafiittioksidin erottelu grafeenioksidiksi perustuu pinnoille funktionalisoitujen happiryhmien erilaisiin ominaisuuksiin.^{5,6,12,15,16} Happiryhmät voidaan hajottaa lämmöllä, jolloin hajoavista happiryhmistä syntyvä kaasunpaine työntää kerrokset erilleen,^{12,18} tai kerrokset voidaan erottaa altistamalla grafiittioksidi vedelle, jolloin grafeenioksidilevyt irtoavat toisistaan happiryhmien halutessa entropian ajamina vuorovaikuttaa vesimolekyylin kanssa.^{5,14,15} Tämän jälkeen syntyneitä grafeenioksidia voidaan käsitellä vahvoilla pelkistimillä, jolloin suurin osa happiryhmistä pelkistyy pois, mutta grafeenin rakenne ei pala täydelliseen ja toistuvaan sp^2 -hybridisaatioon, vaan syntyy niin sanottua pelkistettyä grafeenioksidia.^{5,16,18} Edellä kuvatusti tuotetun grafeenioksidin ja sen pelkistetyn muodon molekyylitason rakenne tulee aina olemaan satunnainen, mutta pelkistetyn grafeenioksidin hiili:happi-suhde on noin 16:1, kun grafeenioksidille hyväksytty empiirinen kaava on " $C_4O(OH)$ " hiili:happi-suhteella noin 2,0:2,9.^{5,6}

Vaikka pelkistetyn grafeenioksidin rakenteesta voidaan edelleen poistaa happea ja rakennetta näin palauttaa edelleen takaisin puhtaan grafeenin tapaiseksi –säännölliseksi ja aromaattiseksi rakenteeksi– lämpökäsittelyillä,⁶ ei grafeenioksidilla ole sen helpposta valmistuksesta huolimatta suurempaa käyttöä esimerkiksi elektroniikan valmistuksessa, koska syntyvää rakennetta ei nykytekniikoilla voida hallita tarkkaan muun muassa jäljelle jäävien ei haluttujen kemiallisten ryhmien vuoksi.^{5,16,18} Esimerkiksi kaasunpainetta käytettäessä tuotettujen levyjen pinnoille jää usein funktionaalisia ryhmiä.¹⁸ Grafeenioksidin ja pelkistetyn grafeenioksidin rakenteet ovat havainnollistettuina kuvassa 4.



Kuva 4: a) Grafeenioksidi hapettuneine ryhmineen. b) Pelkistetyn grafeenioksidin rakenne. Huom. alkuaineet eivät välttämättä ole empiirisessä suhteessa, koska kuvalla kuvataan vain rakenteita. *Chemdraw Professional.*

2.3 Grafeenin valmistus

Grafeenia voidaan tuottaa (tai useammassa tapauksessa erotella) erilaisilla tavoilla, joilla kaikilla on puolensa liittyen tuotetun grafeenin puhtauteen ja saantoon. Grafeenia voidaan erottaa grafiitista liuotinten tai mekaanisen voiman avulla.^{10,12,14,16,53} Joka tapauksessa näiden erotusmenetelmien täytyy voittaa grafeenilevyjen välissä vallitseva sidosenergia ($2 \text{ eV} \cdot \text{nm}^{-1}$)⁵⁴ tavalla tai toisella, että grafiitin muodostavat levyt voidaan erottaa toisistaan.¹² Ensimmäinen varmistettu –vuonna 2010 Nobelilla palkittu – yksittäiskerroksisen grafeenin eristys tapahtui vuonna 2004 Novoselovin tutkimusryhmän toimesta, kun grafiittikerroksia revittiin erilleen teipin avulla.^{1,8–13}

Grafeenikerrosten erottelu tällä niin sanotulla ”Scotch tape -metodilla” perustuu siihen, että grafiittia sidotaan teipin liimapuoleen, jonka jälkeen liimapuoli taitellaan tiiviisti kiinni itseensä tai toisen teipinpalan liimapuoleen, jonka jälkeen liimapuolet revitään erilleen toisistaan.^{10,12,14} Toistamalla teipinpalojen yhteen liimaamista ja irti repimistä useita kertoja, voidaan grafiittia purkaa aina yksittäisiin grafeenikerrokseen asti, jolloin yksittäiskerroksiin päätyminen voidaan havainnoida yksittäishiilikerroksien transmissiivisyydestä juontuvasta pinnan läpinäkyväksi muuttumisesta.^{12,19} Tuotetut grafeenilevyt, jotka ovat yhden tai muutamien kerrosten paksuisia, voidaan tämän jälkeen irrottaa teipistä piilevyyn asetoniliuotuksella, jonka jälkeen liuotusasetonille altistettu piilevy pestään epäpuhtauksista vedellä ja propanolilla.¹² Ohuimpien grafeenilevyjen uskotaan liittyvän piilevyyn, koska niiden suuri pinta-ala/massa-suhde tehostaa

van der Waalsin vuorovaikutuksia ja muita pinta-alaan suoraan verrannollisia vuorovaikutuksia.^{12,17,42}

Toinen sarja täysin mekaanisia tapoja erottaa grafeenikerroksia liittyvät atomivoima- tai tunnelointimikroskopiaan: grafeenikerroksia erotellaan ”taltaamalla” erilleen useammasta kerroksesta, tai raaputtamalla grafiittia pintaa vasten (vrt. kirjoittaminen).^{12,14} Grafeenikerroksia voidaan ”kirjoittaa” –esimerkiksi piioksidiin– raaputtamalla atomivoima- tai tunnelointivirtamikroskoopilla grafiittia pintaa vasten, kun ”taltaaminen” puolestaan tapahtuu ajamalla kyseisten mikroskooppien neulaa jo valmiiksi kiinnitettyä grafiittia vasten, jolloin neula työntää grafiitin kerroksia erilleen ohuemmiksi levyiksi.¹² Näistä kahdesta ”kirjoittaminen” on ”taltaamista” helpompaa ja tuottaa yleensä ohuempia grafeenilevyjä.¹²

Edellä kuvailtujen mekaanisten erottelukeinojen hyvä puoli on se, että niillä voidaan tuottaa halvalla/yksinkertaisesti grafeenia ja grafeenikerroksia, joiden molekylaarisia rakenteita ei ole muokattu, minkä johdosta tuotettujen näytteiden ominaisuudet ja yksittäislaatu ovat erinomaisia.^{10,12,14,16} Mekaaniset erottelukeinot kärsivät huonoina puolinaan kuitenkin tuotettujen grafeenilevyjen kerroslukumäärän lähes mahdottomasta hallinnasta, sekä tuotettujen näytteiden pienestä koosta ja määrästä.^{10,12,16} Lisäksi ”Scotch tape -metodin” tiedetään jättävän joissain tapauksissa teipin kiinnitysaineita tuotetun grafeenin pintaan ja katkaisevan sen kiteitä.¹² Vaikka esimerkiksi ultraäänitaajuudella värähtelevällä timanttiterällä voidaan erotella tasapaksuisia grafeenilevyjä, soveltuvat grafeenikerrosten mekaaniset erottelukeinot huonon saantonsa vuoksi parhaiten vain laboratorio- ja tutkimusnäytteiden valmistukseen, valitettavasti.^{10,12,14}

Mekaanisen erottelun lisäksi grafeenikerroksia voidaan ajaa erilleen fysikaalisesti myös liuottimien avulla.^{10,12,14,16,53} Grafiitin muodostavia grafeenikerroksia erotetaan liuottimilla, jotka tekevät kerrosten dissosioitumisen suotuisaksi, kun kerrosten välisiä sidoksia häiritään sekoittamalla liuosta ultraäänellä, joka värähtelee grafiitin muodostavia grafeenikerroksia erilleen.^{10,12,14,53} Grafeenikerrosten erottelussa käytetään yleensä poolittomia ja/tai mahdollisesti aromaattisia liuottimia, jotka vakauttavat eroteltuja grafeenikerroksia van der Waals- ja π - π -vuorovaikutuksilla.^{12,53} Näiden lisäksi joitain poolisia orgaanisia liuottimia (kuten dimetyyliformamidia ja dimetyyliasetamidia) sekä vesiliukoisia tensidejä voidaan käyttää erottelussa.^{12,53} Erotteluun soveltuvia liuottimia yhdistää kuitenkin yksi ominaisuus: niiden pintaenergiat vastaavat tai lähestyvät grafeenikerrosten pintaenergiaa ($\sim 70 - 80 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$)^{53, 10,12,53} mikä laskee esimerkiksi ultraäänellä systeemiin tuotavan sekoitusentalpian tarvetta kohti nollaa.⁵³ Grafiitin grafeenikerrokseen purkamisen jälkeen ohuimmat ja kevyimmät

kerrokset voidaan erotella raskaammista sentrifugoimalla, jonka jälkeen yhden ja muutaman kerroksen paksuiset levyt voidaan suihkuttaa pinnalle (esimerkiksi piilevylle) talteenottoa ja puhdistusta varten.^{12,53} Grafeenikerrosten toisistaan irti ”liuottamiseen” voidaan lisäksi käyttää ylikriittistä hiilidioksidia, joka ensin tunkeutuu grafiitin kerrosten väliin ja paineen laskiessa kaasuuntuessaan irrottaa grafeenikerroksia kaasunpaineellaan toisistaan.¹⁰ Lopuksi mainittakoon, että hydrofobisia proteiineja ja peptidisekvenssejä voidaan ainakin teoriassa käyttää ohuiden grafeenikerrostumien erotteluun grafiitin kerrosrakenteesta, koska nämä peptidisekvenssit pyrkivät tunkeutumaan grafiitin kerrosten väliin poolittomaan ympäristöön molempien ollessa poolisessa ympäristössä.³⁴

Liutinperusteisella grafeenin erottelulla on monia etuja mekaanisella voimalla erotteluun nähden: liuotinerottelu on taloudellista, helppoa ja helposti skaalattavissa, eikä se sinällään muuta grafeenikerrosten kemiallista rakennetta, joten puhdistetulla tuotteella on erinomaiset –grafeenilta halutut– ominaisuudet.^{10,12,16,53} Grafeenin tuottaminen liuottimilla omaa kuitenkin samoja huonoja puolia kuin mekaaninen erottelu: suhteelliset saannot jäävät pieniksi ja tuotettujen grafeenilevyjen ja -kerrosten koot ovat riippuvaisia täysin aloitusmateriaalista ja näin valtaosin hallitsemattomissa.^{10,12} Keinotekoisesta yksisuuntaisesta pyrolyyttisestä grafiitista (HOPG : **H**ighly **O**riented **P**yrolytic **G**raphite) saadaan aikaan hyvälaatuista grafeenia, mutta kerrosten erottelu on hankalaa.¹² Rakennevirheitä ja epäpuhtauksia sisältävät luonnongrafiitti ja raudanjalostuksesta saatava ”Kishin grafiitti” ovat helpommin eroteltavissa kerroksiksi virheellisten rakenteidensa vuoksi, mutta tuotetussa grafeenissa tulee olemaan rakennevirheitä ja (rauta)epäpuhtauksia.¹² Lisäksi liuotuksen yhteydessä käytetty ultraäänisekoituksen muoto tulee vaikuttamaan tuotettujen grafeenilevyjen ominaisuuksiin, kuten paksuuteen.¹² Tämä ei sinällään ole ongelma, mutta liiallinen ultraäänisekoitus voi liuosta kuumentaessaan indusoida ei haluttuja reaktioita tuotettavan grafeenin ja liuottimen välille.¹²

Grafeenin mahdollinen tuottaminen grafeenioksidin ja tämän pelkistämisen avulla on käsitelty tarkemmin aiemmin (luvussa 2.2). Tästä mainittakoon edelleen, että vaikka grafiitin ja grafeenin hapetus ja pelkistys takaisin on halpaa ja yksinkertaista; ei se tuota ominaisuuksiltaan haluttua tuotetta rakenteen hallitsemattomien muutosten vuoksi (vrt. kuva 1a ja kuva 4b).^{5,10,16,55}

Grafeenia voidaan tuottaa lisäksi kemiallisesti reagoittamalla PAH-yhdisteiksi bentseenirengaspohjaisia polymeerejä tai dendrimeerejä.^{12,16} PAH-yhdisteitä (joista grafeenirakenteita voidaan jatkojalostaa) käytettäessä tarvitaan mieluiten pitkillä alkyyliryhmillä varustettuja (2,4,6)-trialkyylifenyyliä eräänlaisina tieltä liikkuvina molekylaarisina tukitelteinä, jotka estävät PAH-molekyylien kasaantumista ja näin

helpottavat synteisiä parantamalla liukoisuutta.^{12,16} Grafeenin edellä kuvattu kemiallinen synteisi muista aromaattisista molekyyleistä ei tuota suurikokoisia paloja, mutta sallii reunojen helpon funktionalisoinnin halutuilla ryhmillä.^{12,16} Grafeenin tuottaminen grafeenioksidivälimuodon kautta ja liuoskemiallinen synteisi voidaan usein todeta kannattamattomaksi, koska korkealaatuista grafeenia on helppoa –edellä kuvatuilla tavoilla– erotella grafiitin (jota helposti saatavilla) kerroksista.¹²

Kemiallinen kaasufaasipinnoitus (CVD : **C**hemical **V**apour **D**eposition) on suosittu suureen mittakaavaan soveltuva grafeenintuottometodi, jolla voidaan synnyttää rakenteeltaan puhtaita, pinta-alaltaan isoja ja paksuudeltaan ohuita (valtaosin yksikerroksisia) grafeenilevyjä.^{10,12,14,16,55} Kaasufaasipinnoituksessa hiilenlähteenä toimivaa ainetta kuumennetaan höyrystymis-/sublimoitumispisteeseen, jolloin höyrymäinen hiilenlähde kohtaa katalyyttisen siirtymämetallipinnan, joka katalysoi vetykaasun poistumista höyrystyneestä yhdisteestä, minkä jälkeen grafeenia muodostuu katalyyttinä toimivalle metallipinnalle.^{10,12,16,55} Prosessi alkaa mahdollisimman sileän siirtymämetallipinnan kuumennuksella noin 800 – 1000 °C lämpötilassa vety-argon-seoksella käsitellen, mikä puhdistaa metallin pintaa ja parantaa sen rakennetta.^{10,16,55} Tämän jälkeen reaktion hiilenlähteenä toimivaa yhdistettä, kuten alkoholia tai hiilivetyä, kuumennetaan yleensä noin 800 – 1100 °C kaasuuntumisen ja metalliin liukenemisen aikaansaamiseksi.^{12,16,55} Alkoholeja (kuten etanolia) hiilenlähteenä käytettäessä voidaan tosin käyttää matalampia reaktiolämpötiloja (≥ 300 °C), mutta tämä pienentää pinnoituksella saatavien grafeenilevyjen pinta-alaa.⁵⁵

Höyrystymisen jälkeen hiilyhdisteestä vapautuu vetyä katalysoidusti siirtymämetallipinnalla, joka voi koostua nikkelistä, koboltista, kuparista, platinasta, palladiumista, ruteniumista, iridiumista, tai näiden lejeeringistä.^{10,12,55} Pintaan käytetyt metallit vaikuttavat tuotettuun grafeeniin ja saantoon, sekä mahdolliseen grafeenin syntymekanismiin.^{10,12,55,56} Reaktiossa syntyvän grafeenin sitoutumisetäisyys metallipintaan vaikuttaa käänteisesti grafeenilevyjen kokoon: grafeeni muodostaa suurempia levyjä lähemmäksi pintaa esimerkiksi nikkelin ja koboltin kanssa, kuin esimerkiksi platinan ja palladiumin pintaa, joissa levyjen pinta-alat jäävät pienemmiksi.¹² Grafeenin syntymekanismi siirtymämetallilla riippuu myös käytetystä metallista. Useimpien siirtymämetallien –kuten nikkelin ja koboltin– tapauksessa siirtymämetallipintaan jäävä hiili liukenee metallin hilaan kuumuudessa, mistä se poistuu lämpötilan laskiessa ja kiteytyy grafeenikerroksiksi.^{10,12,55} Näitä siirtymämetalleja käytettäessä syntyvien grafeenikerrosten paksuutta voidaan yrittää hallita metallin tai näiden lejeeringin valinalla seuraavasti: ohuempia levyjä voidaan tuottaa valitsemalla metalli tai seos, johon hiilen liukoisuus lämpötilan funktiona on vähäisempi.^{12,55}

Grafeenikerrosten paksuutta voidaan vähentää myös pitämällä hiilipitoisen höyryn osapaine matalana samalla, kun kokonaispaine reaktioympäristössä korkeana.⁵⁵ Kupari eroaa muista käytetyistä siirtymämetalleista siinä, että sen huonon hiililiukoisuuden vuoksi sen pintaan kertyvä hiili ei liukene, vaan alkaa muodostamaan grafeenia jo kuumennuksen aikana.^{12,55,56} Kuparin pinnalla tuotettu grafeeni on yksinomaan yksikerroksista, koska kuumennuksen aikana metallin pinnalle syntyvä ensimmäinen grafeenikerros estää höyrystyneen hiililähteen jatkuvan pääsyn katalyyttiselle pinnalle.⁵⁶ Grafeenin kaasufaasipinnoitus kuparille on kaasufaasipinnoituksista ehkä paras vaihtoehto, koska se tuottaa verrattain helposti yksikerroksista grafeenia, jonka kerrosten lukumäärää voidaan lisätä sekoittamalla kupariin esimerkiksi nikkeliä.^{55,56} Mainittakoon, että kupari eroaa muista siirtymämetalleista lisäksi siten, että esikuumennuksessa ja -käsittelyssä ylijäänyt vety haittaa grafeenin muodostumista sen pinnalla, toisin kuin esimerkiksi nikkelin pinnalla.¹²

Metallipintoja voidaan käyttää tasapaksujen grafeenikerrosten muodostamiseen myös asettamalla siirtymämetallikerros HOPG:in päälle alipaineeseen (jota säätelemällä voidaan myös hallita tuotettujen kerrosten määrää) ja kuumentamalla matalampaan 650 °C lämpötilaan.^{12,57,58} Tällä tavalla tuotettu grafeeni ei ole altis esimerkiksi kaasuuntuneiden hiilivetyjen mukana tuleville epäpuhtauksille.¹² Lisäksi grafeenia voidaan tuottaa höyrystämällä piikarbidista (SiC) piitä pois noin 1000 – 1200 °C lämpötilassa, mutta piikarbidin ja tarvittavien kuumennusvälineiden hinta tekevät tästä epäkäytännöllistä.^{10,14,16}

Yllä esitellyillä grafeenin valmistuspoluilla on selvästi omat heikkoutensa ja vahvuutensa, jotka vaikuttavat niiden valintaan. Nämä kuitenkin kaikki näyttäisivät kiteytyvän valmistuksen taloudellisuuteen, joka määräytyy tuotteen puhtauden (kvaliteetin) ja määrän/tuotannon skaalattavuuden (kvantiteetin) tasapainon mukaan. Yksi näistä valmistusmetodien valintaan vaikuttavista tekijöistä on tuotteen kvaliteettiin liittyvä puhtaus; tarkemmin ottaen puhtaus mahdollisista synteessireagensseista ja adsorboituneista sivutuotteista.¹⁸

3 Grafeenimateriaalien ja proteiinien yhdistäminen

Proteiinit ja näiden biokatalyyttiset muodot: entsyymit, ovat luonnon rakennuspalikkoja, joiden ominaisuuksia voidaan yhdistellä ja muokata grafeeniin fyysisesti yhdistämällä.^{18,20–37} Suuresta lupaavuudestaan huolimatta, grafeenimateriaalien vuorovaikutukset biologisten komponenttien kanssa –muutoksille herkissä– fysiologisissa ympäristöissä voivat aiheuttaa huomattavaa bioyhteensopimattomuutta, mikä pitää ottaa huomioon ja pyrkiä ensin minimoimaan esimerkiksi funktionalisoinnilla.^{18,23–25,34,40}

3.1 Proteiinien rakenne ja vuorovaikutukset

Proteiinit ovat solujen tukirakenteiden ja kemiallisten koneistojen (entsyymeinä toimiessaan) perusrakennuspalikkoja, jotka koostuvat ketjutetuista aminohapoista, jotka jäävät (poly)peptidisekvenssiin ”aminohappojämiksi”.^{20,30–33} Proteiinien rakenne ja täten niiden mahdollinen katalyyttinen toiminta riippuu täysin niiden aminohapposekvensseistä, sekä sekvenssien johdosta proteiineihin liittyvistä prosteettisista ryhmistä.^{30–33,59}

Proteiinisynteesissä käytettävien 20 perusaminohapon aminopäät (N-terminaalit) ja karboksyyli päät (C-terminaalit) kondensoituvat yhteen (kun DNA:sta käännettyä RNA:ta luetaan ribosomissa) muodostaen sekundaarista amidiryhmää muistuttavia peptidisidoksia, jättäen proteiinin primäärirakenteen muodostavien aminohappojämien α -hiiliin liittyneet sivuketjut vapaiksi vuorovaikuttamaan toistensa, muiden (poly)peptidisekvenssien aminohappojämien ja prosteettisten ryhmien kanssa.^{20,30–32,59} Primäärirakenteiden sisältämät sivuryhmät muodostavat tämän jälkeen yksittäisiä sekundäärirakenteita vuorovaikutuksillaan, riippuen ympäristön pH-arvosta ja hydrofobisuudesta/-fiilisyydestä: hydrofobisesti Van der Waals- ja π - π -vuorovaikutuksilla (ei polaariset ja aromaattiset aminohapot: esimerkiksi alaniini ja tyrosiini); poolisesti, kuten vetysidoksilla ja suolasilloilla (polaariset ja varautuneet aminohapot: esimerkiksi seriini, sekä lysyiini [+] ja asparagiinihappo [–]); sekä muodostamalla kovalenttisiä sidoksia (esimerkiksi kysteini).^{20,30,31,59} Nämä sekundaarirakenteiden yksittäiset laskokset vuorovaikuttavat toistensa kanssa edellä mainitusti, muodostaen laajempia tertiäärirakenteita, jotka voivat puolestaan muodostavat muiden polypeptidisekvenssien tertiäärirakenteiden kanssa kvaternäärirakenteita liittymällä yhteen samoilla vuorovaikutuksilla, jotka ohjaavat edellä mainittujen sekundääri- ja tertiäärirakenteiden muodostumista.^{20,30,59} Entsyymien toiminnan kannalta tärkeät prosteettiset ryhmät kiinnittyvät usein suolasilloilla muuhun proteiinin laskokseen tämän kationisista sivuryhmistä: esimerkiksi hemoglobiinin ja myoglobiinin tapauksessa porfyriinin rauta-kationi vuorovaikuttaa suoraan laskoksesta löytyvän histidiinin kanssa.³²

Proteiinien laskostumista voidaan muuttaa ja laskosta denaturoida lämpötilan sekä muiden ympäristötekijöiden muutoksilla: hydrofiilisessä (kuten fysiologisessa) ympäristössä poolittomat sivuryhmät pyrkivät laskostumaan tertiäärirakenteiden sisälle suojaan poolisilta liuottimilta, kuten vedeltä, kun rakenteen pooliset sekä varatut ryhmät pyrkivät jäämään proteiinien ulkopinnoille vuorovaikuttamaan esimerkiksi veden kanssa.^{20,30,59} Hydrofobiseen ympäristöön joutuessaan proteiinin laskos voi purkautua/uudelleen järjestäytyä, kun hydrofiiliset ryhmät pyrkivät vuorovaikuttamaan toistensa kanssa ja hydrofobiset pääsemään kosketuksiin liuotinympäristön kanssa.^{35,59} Tämän vuoksi voidaankin ajatella, että

polypeptidilaskokset vaativat fysiologisen vesiympäristön pysyäksään vakaina.^{35,59} Laskosten kovalenttiset sidokset ja suolasillat ovat vähäisempiä määrältään, vaikka ne vakauttavat laskosta huomattavasti enemmän korkeammilla sidosenergioillaan: tämän vuoksi niiden ajatellaan olevan vähäisemmässä roolissa useimmissa proteiineissa, vaikka ne luovatkin vakaampia laskoksia.^{20,30,31,59} Kovalenttiset sidokset ja suolasillat laskosten rakenteissa ovat riippuvaisia ympäristön pH-arvosta, koska ympäristön hapettavuus/pelkistävyys voi hapettaa auki kovalenttisiä (esimerkiksi kysteiinien muodostamien disulfidisiltojen) sidoksia.^{30,31,59} Proteiinien suolasiltojen pH-herkkyys johtuu niitä muodostavien sivuketjujen pelkistymisestä ja hapettumisesta isoelektristen pisteidensä (pI) mukaisesti, joka johtaa muutoksiin näiden varauksissa, mikä puolestaan vaikuttaa näiden väliseen elektrostatiikkaan.^{31,59} Proteiinien denaturaatio (eli rakenteen menetys) voi johtaa joko proteiinin toiminnallisuuden pysyvään tai väliaikaiseen menetykseen, tai jopa aggregoitumiseen, jolloin avautuneen laskoksen paljastuneet ryhmät alkavat liittymään muihin vastaaviin proteiineihin, mahdollisesti indusoiden vielä ehjiä proteiineja denaturoitumaan ja kasautumaan soluille tuhoisiksi polypeptidikertymiksi.^{30,32,33,59}

Proteiinit voivat toimia rakenteellisina rakennuspalikkoina ja kemiallisina katalyytteinä: entsyymeinä, jotka katalysoivat reaktioita biologisissa ympäristöissä tehokkaasti ja spesifisesti.^{30,32,33,35} Entsyymit ja vasta-aineet (immunoglobuliinit : Ig) ovat selektiivisiä substraateistaan (aineista, joita ne kompleksoivat itseensä reversiibelisti) ja entsyymien tapauksessa tuottamiensa aineiden mahdollisesta isomeriasta.^{30,32,33}

Proteiinien selektiivisyys niitä aineita kohtaan, joiden kanssa ne vuorovaikuttavat, johtuu proteiinien konformaatiosta.^{30,32,33} Laskostuneet proteiinit muodostavat pinnoilleen/sisälleen kuoppia/kammioita, jotka sisältävät substraattien vuorovaikutuksille ”avoimia” aminohappojämien sivuketjuja ja mahdollisia prosteettisia ryhmiä, jotka vuorovaikuttavat orientoivasti ja mahdollisesti reaktioita katalysoivasti.^{30,32,33} Kun substraatti kompleksoituu proteiinin/entsyymin aktiiviseen keskukseen heikoilla vuorovaikutuksilla, se indusoi mahdollisia muutoksia proteiinin laskoksen konformaatiossa.^{30,32,33} Entsyymien tapauksessa aktiivisen keskuksen hydrofobinen vakuoli, tämän laskoksessa orientoituneet sivuketjut, sekä mahdolliset prosteettiset ryhmät katalysoivat tämän jälkeen substraattien reaktioita.^{30,33}

Aktiiviset keskukset tarjoavat liuotinvapaan (luonnossa vedettömän) tilan, eli paljastavat substraatit toisilleen ja orientoivat substraatit oikealla tavalla toisiinsa nähden, sekä pakottavat rakenteellista rasitetta sidosiin (mikä lisää reaktiivisuutta) vääntämällä substraatteja.^{30,33} Lisäksi keskukset tarjoavat protoneja siirtäviä sivuryhmiä, jotka voivat happo-emäs-reaktioillaan indusoida reaktioita substraateissa, siirtää reaktioissa ”liikkuvia” elektroneja, sekä

vakauttaa mahdollisten reaktioiden välituotteita sitomalla näitä heikoilla sidoksilla ja väliaikaisilla kovalenttisilla sidoksilla.^{30,33}

Proteiineja, niiden rakenteita ja näiden rakenteiden muutoksia voidaan tutkia fotonispektrometrian keinoin.^{31,60–65} Aromaattiset aminohappojäämät absorboivat ~280 nm aallonpituudella, minkä lisäksi myös proteiinien konformaatioiden muutoksista johtuvat elektroniset muutokset näkyvät UV/Vis-spektrissä.^{31,65} UV/Vis-spektrometrialla voidaan myös havaita proteiinin kiinnittyminen esimerkiksi grafeenioksidin pintaan.³⁴ Proteiinien rakenteita voidaan erotella FTIR-spektrometrian avulla, koska muutokset laskoksessa liittyvät usein myös sivuketjujen funktionaalisten ryhmien ja näiden värähdystilojen muutoksiin.^{62–64} Lisäksi Raman spektroskopiaa voidaan myös käyttää funktionaalisten ryhmien tutkimiseen.^{60,61} Proteiinien rakennetta ja rakennevuorovaikutuksia voidaan karakterisoida hyvin tarkasti myös käyttämällä NMR-spektrometriaa (NMR : Nuclear Magnetic Resonance).⁶⁶ Esimerkiksi ympäristöstä ja tämän muutoksista johtuvia laskosmuutoksia voidaan kuvata NMR-spektrometrian avulla.⁶⁶

3.2 Grafeenimateriaalien funktionalisoiminen proteiineilla

Grafeenin pintaan voidaan liittää proteiineja ja muita biomolekyylejä joko suoraan kosketukseen heikoilla vuorovaikutuksilla tai käyttämällä molekulaarista välikappaletta eli adapteria.^{21–24,34–37,40} Lisäksi grafeenioksidin ja tämän pelkistetyn muodon pinnoille voidaan liittää proteiineja sekä heikoilla vuorovaikutuksilla, että käyttäen hyväksi näiden pinnoilla luonnostaan esiintyviä kemiallisia ryhmiä ja virheitä vahvojen kovalenttisten sidosten aikaan saamiseksi.^{18,23–26,34,35}

Grafeenimateriaalien, eli eri kerrospaksuisten grafeenilevyjen, grafeenioksidilevyjen ja pelkistettyjen grafeenioksidilevyjen monet yhteiset ominaisuudet tekevät niistä erityisen hyviä materiaaleja biomolekyylien, kuten proteiinien, kiinnitykseen verrattuna muihin (nano)materiaaleihin.^{18,21,34,35} Yksi näistä yhteisistä ominaisuuksista on suuri ominaispinta-ala, jonka vuoksi niiden pintoihin voidaan pakata adsorboituvia ja muilla tavoilla kiinnittyviä proteiineja verrattain suurina määrinä helposti.^{18,24,35}

Grafeenikerrosten lukumäärän ei tiedetä vaikuttavan biomolekyylejä sitovien kovalenttisten tai heikkojen sidosten vahvuuteen suoraan, vaikka kerrosmäärän voidaan ajatella olevan myös yksi grafeenimateriaalien tärkeimmistä ominaisuuksista, joka vaikuttaa muun muassa näiden jäykkyyteen.^{18,34,35} Kiinnitettävien biomolekyylien määrä suhteutettuna grafeenin

kokonaisuutensa on käänteisesti verrannollinen grafeenilevyjen kerrosten lukumäärään, koska kerrostuneessa grafeenilevyssä kaikki mahdollinen grafeenikerrosten pinta-ala ei ole vapaana adsorptioon.^{18,24} Voidaan siis todeta, että grafeenin kerrosmäärä on vaihtokauppa levyn jäykkyyden ja proteiinia adsorboivan pinta-alan välillä. Mainittakoon lisäksi, että kerroslukumäärä tulee vaikuttamaan levyjen elektroniseen herkkyuteen muutoksille, kuten ympäristön kemikaalikoostumuksen ja grafeenimateriaalien omien pintojen muutoksille.³⁶ Grafeenimateriaalien proteiinikomplekseja yhdistää myös se, että niissä vallitsevat vuorovaikutukset tulevat aina olemaan sekoitus useista mahdollisista heikoista vuorovaikutuksista, mahdollisten kovalenttisten liitosten lisäksi.^{24,34,35}

Grafeenin hydrofobiseen ja aromaattiseen pintaan voidaan liittää proteiineja melko pysyvästi käyttäen hyväksi heikkoja hydrofobisia vuorovaikutuksia, kuten Van der Waalsin vuorovaikutuksia, sekä aromaattisuudesta johtuvaa π - π -vuorovaikutusta.^{18,21–25,27,34–36} Proteiinit voidaan liittää tällöin joko suoraan grafeenin pintaan tai käyttämällä polymeeristä välikappaletta, jolloin biomolekyylit jäävät etäisyydelle grafeenista, mikä vähentää ei haluttuja vuorovaikutuksia näiden ja grafeenin välillä.^{27,34,36}

Proteiinien adsorptio suoraan puhtaan grafeenin hydrofobiseen pintaan tapahtuu heikoilla hydrofobisilla Van der Waals- ja π - π -vuorovaikutuksilla: osittain sen vuoksi, että puhtaan grafeenin pinnassa ei ole ryhmiä, joita voitaisiin reagoittaa kovalenttisesti.^{18,21,24,27,34,35,37} Tämä sitoutuminen juontaa juurensa proteiinien hydrofobisista aminohappojämistä peptidiketjuissa, joista erityistapauksina voidaan mainita aromaattiset aminohappojämät.^{21,27,34,37,40} Aromaattisten aminohappojen sivuketjut pyrkivät vaikuttamaan grafeenin pinnan kanssa π - π -vuorovaikutuksilla siten, että ne orientoivat sivuketjunsä aromattiset renkaat samansuuntaisesti –rinnan– grafeenin aromaattisen pinnan kanssa maksimoidakseen vuorovaikutuksen näiden välillä.^{21,34,37}

Näiden π - π -vuorovaikutuksen vahvuus riippuu aromaattisen aminohappojämän identiteetistä polarisaatioherkkyyden kautta.^{21,34} mitä suurempi ja homogeenisemmin konjugoitunut sivuketjun aromaattinen ryhmä on, sitä vahvempaa ja läheisempää sitoutuminen on.²¹ Puhtaaseen grafeeniin aromaattiset sivuryhmät sitoutuvat välille noin 3,2 – 3,5 Å, mikä vastaa sitoutumisvahvuusjärjestystä Trp > Tyr > Phe > His, joka on suoraan verrannollinen vertailtujen aminohappojämien sivuketjujen aromaattisten ryhmien kokoon, sekä jatkuvaan homogeeniseen konjugaatioon.²¹ Aminohapon molekulaarinen geometria ei muutu mitenkään tästä vuorovaikutuksesta, minkä vuoksi grafeenilevyn kaartuminen vähentää sidosvahvuutta, koska aromaattisen sivuryhmän ja grafeenin välinen vuorovaikutuspinta-ala vähenee.²¹ Tämä

pinta-alan ja polarisaatioherkkyyden suora korrelaatio sitoutumisen vahvuuteen voidaan katsoa todisteeksi vallitsevasta hydrofobisesta sitoutumisesta van der Waals- ja π - π -vuorovaikutuksilla.²¹ Tämä katsoo myös yhteen sen kanssa, että suuremman koon – ja tätä kautta suuremman mahdollisen pinta-alan – omaavat proteiinit sitoutuvat hydrofobisiin grafeenipintoihin vahvemmin.³⁴ Tätä havaintoa tukee lisäksi laskennallinen havainto, että yksittäiset kahtaisioniset aminohapot eivät kykene sitoutumaan grafeenin pintaan kunnolla, koska ioniset N- ja C-terminaalit kompleksoituvat veden kanssa mahdollistaen liukenemisen pinnalta.³⁷ Optimioloissa sivuketjujen aromaattiset osat pyrkivät latoutumaan tasaisen grafeenin päälle tavalla, joka muistuttaa orientaatioltaan luonnossa esiintyvän grafiitin grafeenikerrosten latoutumista.²¹

Proteiinien liittäminen suoralla kontaktilla grafeeniin ei ole välttämättä kaikista paras vaihtoehto, mikäli halutaan tuottaa grafeeni/proteiini-komplekseja, joidenka ominaisuudet ovat yhteenliittymiä näiden ominaisuuksista.²⁷ Grafeenin (ja sen johdannaisten) hydrofobiset vuorovaikutukset proteiinien polypeptidisekvenssien kanssa vääntävät proteiinien laskoksia kaikista eniten näiden pyrkiessä maksimoimaan vuorovaikutuspinta-alansa, mikä voi johtaa toiminnallisiin alueisiin kohdistuessaan proteiinin toiminnan tehon muutoksiin, estymiseen tai pahimmassa tapauksessa koko proteiinin denaturoitumiseen.^{27,34,35,40} On siis melko selvää, että mitä enemmän pintaan liitettävät proteiinit laskostuvat pelkästään hydrofobisten (van der Waals/ π - π) vuorovaikutusten avulla; sitä enemmän niiden laskos muuttuu grafeenin pinnalla.²⁷ Lisäksi grafeeni (jos sen taipuisuus sallii) pyrkii maksimoimaan vuorovaikutuspinta-alan vääntymällä ja poimuttamalla itse proteiinin pinnan mukaisesti.³⁴ Tämä grafeenin pinnan geometrian ja suoraan adsorboituvan proteiinin mahdollisten aromaattisten aminohappojämien aiheuttama elektroninen π - π -vuorovaikutus voi lisäksi muuttaa grafeenin elektronisia (muun muassa sähköisiä) ominaisuuksia ilman, että grafeenin omat elektroniset ominaisuudet menetetään lopullisesti, koska grafeenin molekulaarinen rakenne ja sp^2 -hybridisaatio eivät muutu.^{1,17,21,22,24,36,41,50}

Vaikka grafeenin pintaan voidaan suoraan adsorboida proteiineja hydrofobisilla vuorovaikutuksilla melko pysyvästi, liittyy tähän heikoilla vuorovaikutuksilla liittäminen mahdollisiin käyttökohteisiin vaikuttava puoli: ympäristön muutokset (kuten esimerkiksi pH-arvon vaihtelut) voivat johtaa pinnalle suoraan adsorboituneiden polypeptidien huuhtoutumiseen.^{34,35} Tämä johtuu proteiinien polypeptidirakenteita muodostavien aminohappojämien sivuketjujen ympäristön pH-arvon mukana muuttuvista varauksista (esimerkiksi histidiinissä imidatsoli-renkaan typpiryhmissä)³¹, joidenka muutokset riippuvat niille ominaisista protonien assosiaation ja dissosiaation pH-raja-arvoja määrittävistä

isoelektrisistä pisteistä (pI).^{18,23,31,34} Tämä dissosioituminen tapahtuu, kun sivuketjut muuttuvat varatuiksi, koska ionisessa muodossa olevat sivuketjut hylkivät grafeenin hydrofobista pintaa.³⁷ pH-arvon muuttumisen aiheuttama varautuminen ja tästä seuraava dissosiaatio grafeenin pinnalta ovat asteittaisia, johtuen sivuketjujen eroavista isoelektrisistä pisteistä.^{26,31}

Grafeenin pinnan ja siihen liitettyjen proteiinien välisiä epätoivottuja vuorovaikutuksia, kuten denaturoitumista, voidaan välttää liittämällä proteiini etäämmälle grafeenin pinnasta käyttäen välikappalemolekyylejä.^{18,22,23,27,34,36} Nämä grafeenin ja proteiinin väliin asetettavat adapterit (kuten esimerkiksi 1-pyreenibutaanihappo sukkinimidyyliesteri) omaavat usein hydrofobisen ”jalan”, joka vuorovaikuttaa esimerkiksi π - π -vuorovaikutuksilla grafeenin pinnan delokalisoituneen π -elektroniverkoston kanssa, sekä ”pään”, joka sitoo proteiineja kovalenttisesti niiden aminohapporungon sivuketjujen amiini-ryhmiin reagoiden.^{22,23,27,34,36}

1-pyreenibutaanihapon sukkinimidyyliesterissä (PYR-NHS : 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester) PYR-pää koostuu butaanihapolla funktionalisoidusta ”pyreeni-lautasta”, joka sitoutuu grafeenin pintaan π - π -vuorovaikutuksilla polaarissa ympäristössä, kuten vedessä.^{22,34,36} Proteiineja ”ankkuroiva” NHS-pää puolestaan koostuu sukkinimidyyliesteristä (”aktivoitusta esteristä”)²⁷, joka on sidottu ennemmin mainitun PYR-pään butaanihappokomponentin karboksyyliryhmän jäänteeseen tyyppistään.^{22,34,36} NHS-pään sukkinimidyyliesteri reagoi (lievästi emäksisissä oloissa) proteiinin pinnalle jäänteiden (esimerkiksi lysiinien jäänteiden) sivuketjujen amiiniryhmien kanssa, jolloin N-hydroksisukkinimidi dissosioituu proteiinin amiinin korvatussa tämän, mikä synnyttää sekundäärisen amidisillan proteiinin ja adapterin välille.^{22,34} Yksi lupaava muunnos PYR-NHS-välikappaleesta on niin sanottu NHS-tripodi-välikappale, jonka kolmessa pyramidimaisesti alas osittavassa, grafeeniin sitoutuvassa ”jalassa” on jokaisessa ”pyreeni-lautta” ja päässä ”aktivoitu esteri”, joka sitoo proteiinin kovalenttisesti.^{27,28}

On huomattu, että tämän tyyppiset adapterit säilyttävät proteiinien (esimerkiksi immunoglobuliinien) toiminnallisuuden paremmin, kuin yksittäisellä ”jalalla” varustetut adapterit.^{27,28} NHS-pään omaavien adapterien suurimpia erityisuuksia on niiden kyky toimia alustana bioaktiiviselle kuvioinnille, jossa käytetään muun muassa proteiineille soveltuvaa niin sanottua mikrokontaktiprinttausta (microcontact printing : μ CP).^{22,67} Mikrokontaktiprinttauksessa polymeeristä valettuun, halutusti kuvioituun, leimasimeen väliaikaisesti liitetyt (esimerkiksi) solut adsorboituvat leimasimesta lopulliseen kohdepintaansa, kun leimasin painetaan tätä pintaa vasten.⁶⁷ Tämä tekniikka kykenee ainakin 1 μ m resoluutioon.⁶⁷ Tämä vuoksi mikroprinttaus mahdollistaa grafeenipintojen hallitun ja tarkan, pysyvän ja selektiivisen kuvioinnin halutuilla proteiineilla, kun painatuskontakti tuo

proteiinin vapaita amiiniryhmiä reaktioetäisyydelle adapterin NHS-päästä.²² Mainittakoon, että mikropainatus toimii myös puhtaalle grafeenipinnalle, mutta edellä kuvaillun suoran kontaktin haittojen listaan voidaan tässä tapauksessa lisätä, että verrattuna adapteriliitokseen: suora kuviointi adsorbtiolla ei ole yhtä pysyvää, kuin kuvioitu kovalenttinen liittäminen adapteriin.²² Huonoina puolina PYR-NHS-välikappaleiden käytölle voidaan joissain yhteyksissä mainita selvästi aleneva suhteellinen proteiinien adsorptio pinta-alaa kohden, sekä adsorboineen grafeenipinnan vähäisempi jäykistyminen, kun vertailukohteena on suoraan pintaan tapahtuva adsorptio.²⁷

Grafeenipinnan ja proteiinien välisinä välikappaleina voidaan käyttää myös täysin biopohjaisia polymeerejä ja peptidejä, mikä on mahdollisesti suuri etu: muuntogeenisiä soluja voidaan käyttää haluttujen adapterien valmistamiseen DNA-templaatin mukaan.²³ Nämä polypeptidisekvenssit ovat usein peräisin luonnossa esiintyvistä proteiineista ja ne sisältävät noin kolme selvää osuutta.²³ Grafeenin pintaan adsorboituva pää (GB), joka koostuu valtaosin aromaattisista aminohappojämistä, sekä pelkistetyn grafeenioksidin tapauksessa joistain varatuista peptideistä (esimerkiksi Asn).²³ Välikappaleosa, joka pitää liitettävän solun tai proteiinin etäisyydellä grafeenipinnasta ja jolla voi olla proteiiniesikuviltaan (esimerkiksi elastiinilta) peräsin olevia ominaisuuksia.²³ Sekä biomolekyyliä sitova pää, jossa sijaitsee soluja tai proteiineja heikosti tai kovalenttisesti sitova peptidiketju (esimerkiksi soluja tukirankaan sitova integriini).²³

Toisin kuin puhtaassa grafeenissa, grafeenioksidissa on pinnalla huomattavia määriä reaktiivisia happiryhmiä, joihin proteiineja ja muita biomolekyyliä voidaan liittää kovalenttisesti.^{24,26,34,35} Lisäksi sen pinnan happiryhmiä voidaan muokata: esimerkiksi epoksiryhmät ja mahdolliset esteriryhmät voidaan muuttaa karboksyyliiryhmiksi pelkistämällä nämä ensiksi hydroksidiryhmiksi ja tämän jälkeen reagoittamalla nämä kloorietaanin kanssa.²⁴ Yksinkertainen tapa liittää proteiineja suoraan grafeenioksidiin on reagoittaa grafeenioksidin, sekä tämän pelkistettyyn muotoon jääneisiin karboksyyliiryhmiin välireagenssia: esimerkiksi n-hydroksidisukkinimidia (NHS), joka voi reagoida edelleen proteiinien vapaiden amiiniryhmien kanssa, muodostaen amidisillan, kuten PYR-NHS-adapterien tapauksessa.^{24,26,34,35}

Proteiineja voidaan liittää täysin kovalenttisesti grafeenioksidiin myös muodostamalla pitkiä hiilivetyketjuja näiden ja grafeenioksidin välille: karboksyyliiryhmiin funktionalisoidaan ensiksi halutun pituisia diamiineja, jotka liittyvät grafeenioksidin pinnalle amidisiltojen avulla ja omaavat tämän vastaisessa päässä vapaan amiiniryhmän.³⁵ Näihin vapaisiin amiiniryhmiin voidaan reagoittaa taas halutun pituisia dialdehydejä, jolloin grafeenioksidin pinnalle

muodostuneet ketjut pitenevät saadessaan keskiosiansa sekundäärisiä imiinisiltoja ja vapaisiin päihinsä aldehydiryhmii.³⁵ Nämä vapaat aldehydiryhmät voivat reagoida proteiinien vapaiden amiiniryhmien kanssa, muodostaen kovalenttisia siltoja (sekundaarisia imiiniryhmiä) proteiinien ja niitä grafeenioksidein yhdistävien hiilihyaattiketjujen välille.³⁵ Grafeenioksidin ja proteiinien yhteen liittämisesssä etäisyydelle toisistaan voidaan käyttää välikappaleina myös peptidiketjuja ja muita biologisia polymeerejä.^{24,34} Tyypillisiä esimerkkejä tällaisista ovat polyetyleeniglykaani (PEG) ja polylysiini-polymeerit.^{24,34}

PEGyloinnissa grafeenioksidin pinnan karboksyyliiryhmiin reagoitetaan amiiniryhmiin ketjunsä päättäviä polyetyleeniglykaaneja kovalenttisesti, käyttäen hyväksi edellä kuvailtuja N-hydroksidisukkinimidi-välireagenssia käyttäviä reaktioita, minkä jälkeen liitettyjen polymeerien vapaiksi jääneisiin amiineihin voidaan liittää proteiineja uudella NHS-käsittelyllä.^{24,34} Polylysiinien kovalenttinen funktionalisointi puolestaan tapahtuu suoralla reaktiolla grafeenioksidin epoksiryhmien ja polylysiinien amiiniryhmien välillä emäksisissä oloissa.²⁴ Polylysiinien liittämisen tällä reaktiolla myös pelkistää grafeenioksidia, mikä voi olla eduksi tuotteen jatkokäsittelyssä.²⁴

Grafeenioksidia kovalenttisesti funktionalisoitaessa voi kuitenkin tapahtua sivussa myös adsorptiota heikoilla vuorovaikutuksilla esimerkiksi grafeenioksidein jääneisiin hapettumattomiin, aromaattisuutensa säilyttäneisiin, alueisiin π - π -vuorovaikutuksilla.^{18,23-25,34,35} Näistä aromaattisuutensa säilyttäneistä alueista grafeenioksidin pinnalla kertoo lisäksi se, että täysin peptidipohjaiset, aromaattisia aminohappojämiä sisältäviä grafeeniin adsorboituvia päitä (GB) sisältävät biopolymeerit voivat sitoutua myös grafeenioksidin pintaan.²³ Sitoutuminen on tosin 80 % vähäisempää, kuin esimerkiksi pelkistetyn grafeenioksidin pintaan, mikä viittaa sitoutumisen suoraan verrannollisuuteen sp^2 -hybridisaation ja näin aromaattisen pinnan määrään grafeenimateriaalin pinnalla.²³ Adapterimolekyylin tai -hiiliketjun muodostaminen liitettävän proteiinin ja grafeenioksidin välille minimoi epähaluttuja vuorovaikutuksia grafeenioksidin ja proteiinin välillä, kuten edellä mainitusti grafeenin ja proteiinien välillä.³⁴

Grafeenioksidein proteiineja adsorboivista heikoista vuorovaikutuksista ilmeisimmät ovat vetysidokset ja elektrostaattiset vuorovaikutukset.^{18,24-26,34,35} Tämä voidaan huomata esimerkiksi aromaattisten aminohappojämien sitoutumisesta: laskennallisesti on todettu, että vaikka vuorovaikutusta tapahtuu hydrofobisesti esimerkiksi π - π -vuorovaikutuksilla, on aromaattisten aminohappojämien sidosvahvuusjärjestys grafeenioksidin kanssa His > Trp > Tyr > Phe, jonka erot puhtaan grafeenin sidosvahvuusjärjestykseen johtuvat sivuketjujen mahdollisuuksista vuorovaikuttaa elektrostaattisesti.^{24,34,35} Tästä sidosvahvuusjärjestyksestä

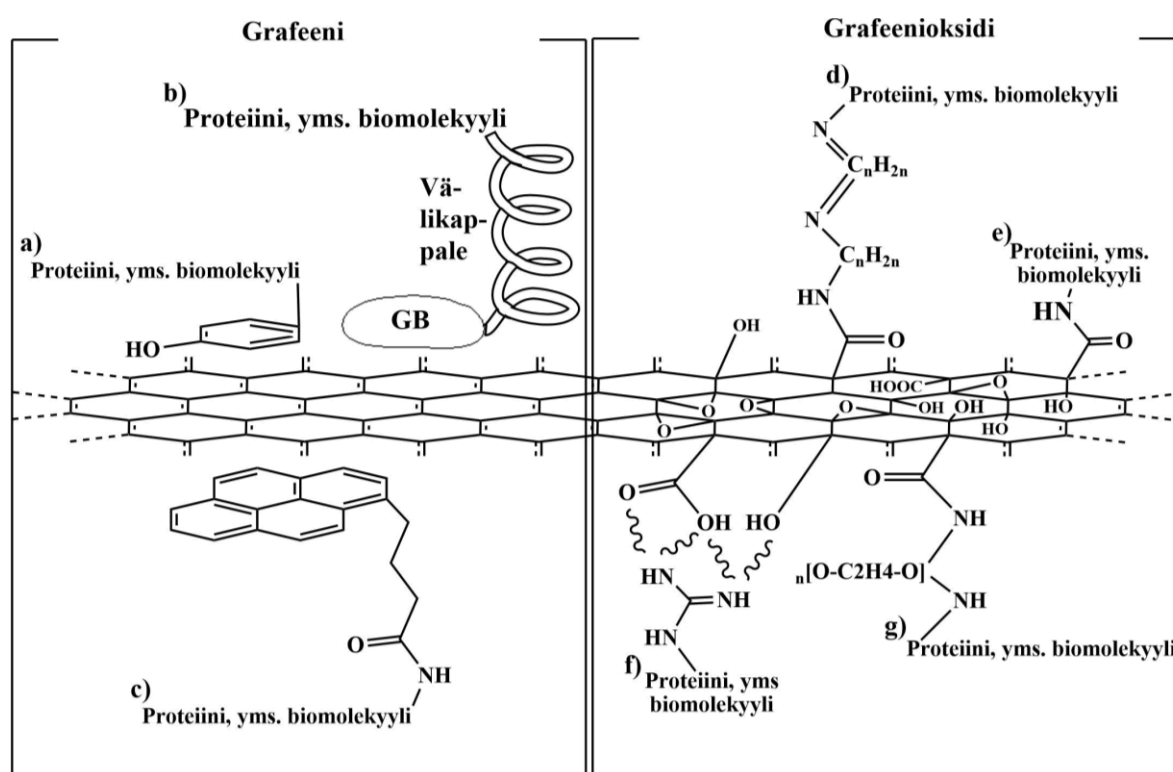
mainittakoon tosin, että Zhang, Y.; *et al.* antavat ymmärtää julkaisussaan³⁴ yhdeksi lähteekseen Rajesh, C.; *et al.* julkaisun²¹, vaikka tässä ei ainakaan suoraan selvitetä grafeenioksidin kohdistuvaa sitoutumista. Elektrostatiikan ja vetysitoutumisen pääasiallisuus vuorovaikutuksina grafeenioksidin ja proteiinien välillä ilmenee lisäksi proteiinien grafeenioksidi-affiniteetin kasvuna niiden varauksellisten aminohappojämien konsentraation mukana.²⁶ Tosin painotettakoon, että hydrofobiset vuorovaikutukset voivat silti olla osa kokonaisvuorovaikutusta,^{18,23–25,34,35} kuten edellä on todettu. Happiryhmien lisäksi grafeenioksidin voi liittyä proteiineja myös sen valmistuksesta jääneisiin kidevirheisiin, kuten puhtaan grafeenipinnan tapauksessa.²⁵

Kuten puhtaassa grafeenissa, grafeenioksidin ja proteiinien väliset heikot vuorovaikutukset riippuvat ympäristöstä ja sen muutoksista (esimerkiksi ionivahvuuden ja pH:n), minkä vuoksi nämä muutokset voivat saada adsorboidut proteiinit dissosioitumaan grafeenioksidin pinnalta helpommin, kuin kovalenttisesti liitetyt.^{18,24,26,34,35} Puhtaan grafeenin ja proteiinien välille jo esitettyjen heikkojen (hydrofobisten) vuorovaikutusten ympäristöpohjaisten muutosten lisäksi, elektrostaattiset vuorovaikutukset grafeenioksidin ja proteiinien välillä saattavat muuttua hylkiviksi pH-arvojen noustessa, vapauttaen proteiinit.^{18,24,26,34}

Tämä muutos sitovasta hylkivään vuorovaikutukseen johtuu korkeiden pH-arvojen aiheuttamasta muutoksesta aminohappojämien sivuketjuissa, jossa positiivisesti tai neutraalisti varautuneet ryhmät hapettuvat kohti negatiivista varausta menettäessään protoneja, kun niiden isoelektriset pisteet ylitetään.^{26,31} Kuten puhtaan grafeenin ja proteiinien hydrofobisten vuorovaikutusten tapauksessa: proteiinien pinta-aminohappojen sivuketjujen eroavien isoelektristen pisteiden (pI) vuoksi proteiinien dissosiaatio grafeenioksidin pinnasta on asteittaista pH:n nousun suhteen.^{26,31} Tämän vuoksi proteiini-kohtainen pH:n puskurointi oikealle välille on tärkeää proteiinien suorassa adsorptiossa grafeenioksidinkin pinnalle.^{26,34} Grafeenioksidipinnalle liitettyjen proteiinien laskoksiin pätevät myös samat vaikutukset kuin puhtaan grafeenin pinnalle adsorboituihin: ne voivat vääristyä ja tätä kautta proteiinin toimintateho voi muuttua: tässä tapauksessa laskoksen ja grafeenioksidipinnan happiryhmien vuorovaikutusten seurauksena.^{26,34,35} Näiden välisen vuorovaikutuksen luonne ja vahvuus kuitenkin riippuu proteiinin laskoksesta.²⁶ Suoraan grafeenioksidin pintaan esimerkiksi amidisilloilla kovalenttisesti funktionalisoidut proteiinit/entsyymit eivät myöskään välty tältä.^{24,26}

Grafeenioksidin pinnan hallitusta proteiinkuvioinnista mainittakoon, että laserin avulla grafeenin ja grafeenioksidin pintaa voidaan poimuttaa haluttuihin muotoihin ja grafeenioksidin happiryhmiä pelkistää pois hallituiksi kuvioiksi, jolloin pintojen proteiini-affiniteettia ja

funktionalisointireittiä voidaan muokata sijaintikohtaisesti.^{35,68–70} Lisäksi erilaiset proteiinit vuorovaikuttavat grafeenioksidin ja puhtaan grafeenipinnan läheisyydessä eri tavoilla ja mukautuvat näihin: esimerkiksi piparjuuren peroksidaasientsyymi (HRP : Horseradish peroxidase) ja oksalaattioksideasi (OxOx : Oxalate oxidase) adsorboituvat valtaosin hydrofobisilla vuorovaikutuksilla grafeeniin ja pelkistettyyn grafeenioksidein, mutta grafeenioksidin osittaisvarattujen happiryhmien läheisyydessä elektrostatiikka ja vetysitoutuminen vaikuttavat voimakkaasti, kunhan pH-arvot pysyvät poissa ääriarvoista.^{26,34} On tosin huomattu, että OxOx ja HRP adsorboituvat paremmin grafeenimateriaaliin mitä pelkistyneempää se on.³⁴ Tästä on voitu päätellä, että valintaan grafeenioksidin, sen pelkistetyn muodon ja puhtaan grafeenin väliltä proteiinien adsorptiopinnoiksi vaikuttaa adsorboitavan proteiinin pinnan aminohappojäänteiden tyytit, eli proteiinin pinnan suhteellinen kyky vaikuttaa erilaisilla heikoilla vuorovaikutuksilla.³⁴ Hapettuneiden grafeenioksidipintojen eduksi edellä mainitussa valinnassa (verrattuna pelkistyneempiin grafeenimateriaaleihin) voidaan todeta sen taipumus vuorovaikuttaa elektrostaattisesti ja vetysidoksilla: sitä pelkistyneemmät, hydrofobisesti vuorovaikuttavat grafeenipinnat denaturoivat proteiineja ja entsyymejä voimakkaammin.³⁴ Edellä esiteltyt, lähteiden mukaan yleisesti kuvailut,^{18,21–28,34–37} grafeenimateriaalien funktionalisointikeinot ovat kuvattuna kuvassa 5.



Kuva 5: Proteiinien ja näiden tapaisten biomolekyylien kiinnitystapoja grafeenimateriaaleihin. a) Suora hydrofobinen adsorptio puhtaaseen grafeenipintaan. b) Adsorptio etäisyydelle aromaattiseen grafeenipintaan polypeptidiadapterin (joka koostuu grafeeniin adsorboituvasta aromaattisesta päästä

(GB); mahdollisesti funktionaalisesta välikappaleesta; sekä itse kiinnittyneestä proteiinista tai jostakin biokomponentista) avulla. c) Adsorptio etäisyydelle kemiallisen adapterin (esimerkiksi NHS-PYR) avulla. d) Kovalenttinen funktionalisointi grafeenioksiidiin luomalla pitkä hiilivetyäinen ”kovalenttinen silta” proteiinin ja grafeenioksidin välille. e) Funktionalisointi suoraan grafeenioksidin pinnan happiryhmiin kovalenttisilla reaktioilla. f) Proteiinin adsorptio grafeenioksidin happiryhmiin koordinoivilla heikoilla vuorovaikutuksilla (vetysidokset ja elektrostatiikka). g) Proteiinin funktionalisointi grafeenioksidin pintaan käyttämällä kovalenttisesti funktionalisoitua biopolymeeriä (kuten polyetyleeniglykolia). Kuva koostettu useista eri lähteistä.^{18,21–28,34–37} *ChemDraw, MS Paint.*

3.3 Grafeenimateriaalien biologiset vaikutukset ja vaikutukset proteiinien kanssa

Grafeenimateriaalien ja proteiinien yhteisvaikutusten tarkempi esittely voidaan aloittaa ilmeisimmällä: grafeenimateriaalien vaikutuksesta entsyymien katalyyttiseen aktiivisuuteen ja vakauteen. Grafeenimateriaaleihin, kuten grafeenioksiidiin ja puhtaaseen grafeeniin funktionalisoidut proteiinit ovat helpompia käsitellä, varastoida, puhdistaa ja muunnella kuin veteen liuenneina olevat, koska grafeenimateriaalin palanen on helpommin käsiteltävissä ja siirrettävissä kuin yksittäiset proteiinirakenteet.^{34,35} Lisäksi liitettyjen proteiinien toimintaa voidaan muokata pelkän grafeenialustan muodon ja rakenteen muokkauksella.³⁴ Esimerkiksi grafeenioksidin tiedetään joissain tapauksissa pelkän denaturoinnin lisäksi laskostavan polypeptidien rakenteita uudestaan pintojen läheisyydessä vakaampiin muotoihin: Bs2-esteraasin on todettu muuttavan α -kierteitään β -levyiksi vuorovaikuttaessaan grafeenioksidin ja sen amiinijohdannaisten kanssa, vähentäen aktiivisuuttaan.³⁵

Grafeenimateriaalien pintoihin liitettyjen proteiinien toiminnallisuus (esimerkiksi katalyyttinen aktiivisuus) voi joissain tapauksissa säilyä tai jopa tehostua ennemmin esitellyn vaimenemisen ja katoamisen sijaan, kun proteiinien laskokset vuorovaikuttavat grafeenin pinnan ja/tai sen ryhmien kanssa.^{34,35} Esimerkiksi oksalaattioksidaasin (OxOx) katalyyttinen aktiivisuus voi lisääntyä sen adsorboituessa suoraan hydrofobisempiin grafeenipintoihin.³⁴ Lisäksi grafeenioksidin (jonka tiedetään sitovan kationeja ja metallipartikkeleja happiryhmiinsä)^{18,23,34} tiedetään vääntävän polypeptidien, kuten sytokromi C:n (cyt c) ja piparjuuren peroksidaasin (HRP) rakenteita: paljastaen niiden prosteettisia hemiryhmiä vetämällä niitä kohti pintaa ilman, että entsyymien aktiivisuudesta vastaava laskos muuten muuttuu, lisäten aktiivisuutta.^{34,35} Täytyy kuitenkin todeta, että HRP:n on havaittu menettävän kokonaisaktiivisuuttaan grafeenioksidin pintaan heikoilla vuorovaikutuksilla (elektrostatiikalla ja vetysidoksilla) adsorboituessaan Zhang, J.; *et al.* tutkimuksissa.²⁶

Grafeenin ja sen johdannaisten pintoihin liitettyjen proteiinien ja entsyymien on todettu usein olevan aktiivisuudeltaan pH- ja lämpövakaampia kuin vapaiden proteiinien.³⁴ Tämä voi juontua siitä, että entsyymit eivät menetä katalyyttisiä ominaisuuksiaan, kunhan niiden aktiivisten keskusten laskokset säilyvät.³⁵

Jo esitettyjen seikkojen perusteella voitaisiinkin ehkä väittää, että grafeenimateriaaliin liitetyn polypeptidin lisääntyneen vakauden voidaan ajatella olevan seurausta entsyymien aktiivisten keskusten säilymisestä edes jonkin verran toiminnallisina, kun proteiinien grafeeniin sitoutumisen aiheuttamien vuorovaikutusten seurauksena muut proteiinien laskokset ovat jo denaturoituneet mahdollisimman paljon. Tällöin voitaisiin spekuloida, että aktiivisten keskusten edemmät rakennemuutokset vaikeutuvat, kun niihin yhteydessä olevat muut laskokset ovat valmiiksi grafeenimateriaalipinnan luoman ympäristön mukaisessa minienergisisä konformaatioissa, jolloin ympäristötekijöiden kyvyn aiheuttaa konformaatiomuutoksia täytyy olla vähäisempi.

Proteiinien mahdollisesti tehostunut katalyyttinen aktiivisuus itsessään, tai päinvastaisissa tapauksissa aktiivisuuden mahdollista alentumaa kompensoiva käsittelyn helpottuminen ja mahdollinen vakautus ympäristön muutoksilta, tekevät proteiinien ja grafeenimateriaalien komposiitit houkuttelevimmiksi vaihtoehdoiksi, kuin esimerkiksi liuoksessa vapaana olevat proteiinit.³⁴ Hyvänä esimerkkinä tällaisesta komposiitista voidaan mainita hemoglobiinista ja grafeenioksidilevyistä muodostettava hydrogeeli, joka ylittää puhtaan hemoglobiinin kaikissa edellä mainituissa ominaisuuksissa, mukaan lukien aktiivisuudessa.³⁴ Voidaan myös mainita, että Zhang, J.; *et al.* ovat julkaisussaan²⁶ havainneet, että grafeenioksidipintojen happiryhmiin heikoilla vuorovaikutuksilla adsorboidut HRP-entsyymit omaavat samanlaisen entsyymaattisen aktiivisuuden/tehon riippumatta adsorboituneen entsyymin konsentraatiosta/määrästä (K_{cat} ja $K_{cat} \cdot K_M^{-1}$ lisääntyvät vain marginaalisesti).²⁶ Julkaisussa myös todetaan, että entsyymien adsorptio-/kuvioitumistiheyden täytyy sallia substraateille ja tuotteille tarpeeksi tilaa (reittejä) siirtyä aktiiviseen keskukseen ja pois.²⁶ Julkaisussa myös havaittiin, että HRP:t ottivat korkeintaan 50 % kaikesta mahdollisesta pinta-alasta käyttöönsä, vaikka proteiiniliuoksen konsentraation nostoa olisi jatkettu.²⁶ Lisäksi steerisen eston muuttumisen todettiin vaikuttavan kokonaisaktiivisuuteen vähemmän, kuin entsyymikohtaisten adsorboivista vuorovaikutuksista johtuvan laskosten vääristymän.²⁶

Proteiinien, kuten kaikkien peptidien ja substraattien, liittäminen ohuiden grafeenimateriaalien pintaan muokkaa grafeenille aiemmin esiteltyjä herkkiä elektronijakaumia ja tätä kautta havaittavia sähköisiä ominaisuuksia, kuten johtavuutta.^{22,24,36} Näiden proteiinien ja

substraattien spesifinen liittyminen ja irtoaminen, sekä näistä seuraavat biomolekyylien muutokset ja ympäristöön tuotetut aineet, tulevat edelleen muokkaamaan proteiineilla funktionalisoitujen grafeenimateriaalien (sähköisiä) ominaisuuksia.³⁶ Lisäksi kokonaisten toiminnallisten solujen kiinnittyminen grafeenimateriaalien läheisyyteen voi indusoida sähköisesti havaittavia muutoksia grafeenimateriaalien elektronirakenteessa.²² Esimerkiksi glukoosikonsentraation havainnointia on tutkittu lupaavilla tuloksilla liittämällä glukoosioksidaasia (GOx) grafeenista valmistettuun kanavatransistoriin (FET : **Field Effect Transistor**).³⁶ On todettu, että GOx/FET-sensorin herkkyyttä voidaan säätää transistorin etujännitettä (BIAS voltage) säätämällä.³⁶ Vasta-aineita eli immunoglobuliineja (Ig) grafeeniin funktionalisoimalla (siton, että toiminnallisuus säilyy) voidaan grafeenipinnasta muodostaa hyvin substraatti-/antigeenispesifinen korkea affiniteetin reseptori, joka voi toimia sähköisenä sensorina.^{35,36} Mainittakoon, että monien vasta-aineiden sitoutuminen antigeeneihinsä on äärimmäisen korkeista affiniteeteista johtuen pysyvää, eikä reversiibeliä, mikä vähentää niiden soveltuvuutta ympäristön ainekonsentraatioiden muutoksiin dynaamisesti reagoivina reseptoreina sensoreissa.³⁵

Grafeenimateriaalien ja ympäristön välisiä vuorovaikutuksia ja bioyhteensopivuutta voidaan säätää funktionalisoimalla niiden pintoja proteiineilla.^{18,23–25,34,40} Näitä vuorovaikutuksia voidaan myös yhdistellä yksittäiseen pintaan erilaisilla pinnan funktionaalisten ryhmien esimuokkauksilla ilman, että bioyhteensopivuus kärsii: esimerkiksi edellisessä luvussa (3.2) esitellyillä grafeenimateriaalien pintojen proteiinifunktionalisointikeinoilla ja kuviointitavoilla (μ CP ja paikallinen pelkistäminen laserilla ennen reagoittamista) voidaan liittää useita erilaisia polypeptidirakenteita (kuten vasta-aineita) halutuilla orientaatioilla.^{22,24,35}

Grafeenin ja sen johdannaisten vesiliukoisuutta (esimerkiksi biologisessa ympäristössä) voidaan säätää pinnan funktionalisoinnilla ja hapetusasteen asteittaisella muuttamisella.^{18,23,24,34} Puhdas grafeeni on hydrofobista, toisin kuin grafeenioksidi, minkä vuoksi se aggregoituu polaarissa (hydrofiilisessa) ympäristössä; sen vesiliukoisuutta voidaan parantaa peittämällä sen pinta polaarilla ryhmillä (esimerkiksi happiryhmillä).^{18,34} Grafeenioksidi liukenee luonnostaan veteen ja muihin polaarisiin liuottimiin sen happiryhmien muodostamien vetysidosten sekä elektrostatiikan vaikutuksesta, mutta mikäli sitä halutaan dispersoida poolittomiin liuottimiin esimerkiksi poolitonta ympäristöä vaativia orgaanisia reaktioita varten, grafeenioksidin pintaa tulee peittää poolittomilla ryhmillä, kuten (poly)peptideillä ja polymeereillä.^{18,23,24} Esimerkiksi aiemmin mainitut elastiini ja siitä johdetut bioperäiset peptidipolymeerit voivat estää grafeenioksidia aggregoitumasta poolittomissa ympäristöissä, kunnes jokin polymeerin peptidisekvenssistä riippuva ympäristötekijä, kuten pH tai lämpötila,

indusoi nämä peptidipohjaiset polymeerit aggregoitumaan toisiinsa.²³ Koska grafeenimateriaaleja, kuten grafeenioksidia ja sen pelkistettyä muotoa, voidaan kuumentaa etäältä (esimerkiksi infrapuna)laserilla, voidaan elastiinimaisilla ryhmillä funktionalisoituja grafeenimateriaaleja pakottaa aggregoitumaan hallitusti.^{23,24}

Paljaat grafeeni- ja grafeenioksidipinnat ovat luonnostaan sytotoksisia tai eri tavoilla muuten haitallisia kudoksille, mutta tätä voidaan muuttaa proteiineilla, biopolymeereillä ja muilla vastaavilla aineilla funktionalisoimalla, mikä parantaa bioyhteensopivuutta.^{18,25,34,40} Tämä täytyy ottaa huomioon, koska mekaanisesti erilleen liotetut grafeenikerrastot ja eroteltu grafeenioksidi ovat yleisessä käytössä biosovelluksissa, koska näiden tuotanto takaa tarpeeksi puhtaan/tasalaatuksen tuotteen tarpeeksi halvalla.²⁴ Näiden valmistus ja jatkokäsittely voivat kuitenkin silti jättää epähaluttuja ”jäätteitä” näiden pintoihin: esimerkiksi aiemmin mainittu grafiittioksidin happiryhmien hajottaminen grafeenikerroksia erottavan höyrynpaineen aikaansaamiseksi voi jättää jälkeensä reagoivia happiryhmiä ja yksittäiset/ketjutetut hapetus-pelkistys-reaktiot voivat jättää grafeenimateriaalien pintoihin epähaluttuja adsorbantteja.¹⁸ Lisäksi grafeenimateriaalien ominaisominaisuudet voivat itsessään tehdä grafeenimateriaaleista vaarallisia biologisille systeemeille.¹⁸ Molempien laajat pinnat voivat toimia katalyyttinä ja/tai indusioijina reaktioille, jotka voivat vaikuttaa solujen toimintoihin: erityisesti grafeenioksidin tapauksessa, koska tämän pinta sisältää luonnostaan happiryhmiä ja muita kidevirheitä.¹⁸ Lisäksi siinä, missä puhdas grafeeni ja pelkistetyimmät grafeenioksidit häiritsevät lipidien ja (poly)peptidien toimintaa esimerkiksi solun kalvoilla hydrofobisesti; voivat grafeenioksidin happiryhmät vahingoittaa solukalvoja indusoidessaan kovalenttisia reaktioita ja tuottaa hapettavia ryhmiä.^{18,25}

Grafeenioksidin pintaryhmistä johtuvan sytotoksisuuden on todettu vähentävän sille altistettujen ihmisen (A549) solukasvustojen aineenvaihduntaa jopa 50 % välittömästi altistuksesta, minkä on tulkittu viittaavan hapetusvaurioihin.²⁵ Lisäksi grafeenioksidin ja tämän pelkistetyn muodon tiedetään olevan todella antibakteerisia.¹⁸ A549-solukuolemien on todettu vähenevän tai estyvän lähes täysin, kun grafeenioksidi peitetään täysin biopolymeereihin esimerkiksi PEGyloimalla happiryhmiä tai inkuboimalla grafeenioksidi naudan sikiön (veri) seerumissa (FBS : **F**etal **B**ovine **S**erum), jonka on todettu liittyvän grafeenioksidin happiryhmiin suurella affiniteetilla.²⁵ Päälystäänsä grafeenioksidin pinnan assosiaationsa yhteydessä, FBS yksinkertaisesti passivoi happiryhmiä reagoimasta edelleen solun osien (kuten solukalvon) kanssa, sekä muodostaa ympäristöä grafeenioksidilta ja grafeenioksidia ympäristöltä suojaavan biopolymeerikalvon.²⁵ Grafeenioksidin sytotoksisuuden ei ole havaittu riippuvan FBS-käsitellyn grafeenioksidin tapauksessa lämpötilasta, mutta paljaan

grafeenioksidin sytotoksisuuden on todettu olevan suoraan verrannollinen ympäristön lämpötilan kanssa.²⁵ Tämän vuoksi epäillään, että solukalvon jäähmydellä voi olla käänteinen yhteys grafeenioksidin sytotoksisuuteen, mikä on sinällään linjassa havainnon kanssa, jonka mukaan biopolymeeripeitot estävät grafeenioksidin kykyä läpäistä solukalvoja.²⁵ Voidaankin todeta, että grafeenioksidin funktionalisointi biomolekyyleillä lisää tarvittaessa liukoisuuden lisäksi myös sen bioyhteensopivuutta.²⁴

Pelkistyneemmät grafeenin muodot, kuten puhdas grafeeni,¹⁸ ovat myös sytotoksisia: ne aiheuttavat soluille tuhoa tunkeutuessaan soluihin ja häiritsemällä proteiinien sisäisiä ja ulkoisia hydrofobisia vuorovaikutuksia.⁴⁰ Kohdatessaan solun proteiinin polaarissa ympäristössä, grafeenilastu voi liukua tämän kvaternäärirakenteen alayksiköiden (tertiäärirakenteiden) väliin, koska sen pinta sitoo näitä tertiäärirakenteita voimakkaammin kuin nämä toisiaan, johtuen suuremmasta vuorovaikutuspinta-alasta.⁴⁰ Tämä välikappaleena toimiva grafeenipinta sallii erotettujen alayksiköiden liikkua toisista erillään, mikä deaktivoi proteiinin.⁴⁰ Veren proteiinien on todettu vähentävän tätä grafeenimaisten materiaalien (kuten hiilinanoputkien) sytotoksisuutta, kuten FBS:än tapauksessa grafeenioksidin kanssa.^{25,40} Lopuksi voidaan mainita, että siinä missä grafeenioksidin on todettu päätyvän soluissa vesikkeleihin, voivat pelkistyneet grafeenipinnat edellä kuvaillun lisäksi synnyttää sytoplasmassa solulle hapettamalla vahingollisia oksidantteja, eli reagoivia happiryhmiä (ROS : **Reactive Oxygen Species**).^{18,25} Lisäksi tiedetään, että grafeenimateriaalien tunkeutuminen soluihin riippuu niiden koosta: lastut, jotka ovat korkeintaan 5 µm leveitä, voivat läpäistä solukalvoja, toisin kun lastut, joiden leveys on vähintään 25 µm: näiden tiedetään voivan toimia kasvualustana soluille.¹⁸

Grafeenimateriaalien vaikutukset riippuvat niiden rakenneominaisuuksien, kuten koon, lisäksi myös niiden kohdekudoksesta.¹⁸ Levymäisten grafeenimateriaalien tiedetään tukkivan erilaisia suodattimia pelkän kiderakenteensa vuoksi ja ne kertyvät hengitettynä keuhkorakkuloihin, mikä on huolestuttavaa, koska muun muassa grafiittipölyn tiedetään aiheuttavan keuhkofibroosia.¹⁸ Huolestuksen aiheetta lisää tieto siitä, että tulehdusentsyymien ja vetyperoksidien tiedetään tuhoavan grafeenimateriaaleja.¹⁸ Alveolien herkkyyttä verrattuna esimerkiksi itse ilmväyliin pahentaa se, että niihin ei erity suurinta osaa muita keuhkojen osia suojaavaa limaa, joka sisältää poolittomia hiilivetyketjuja sisältäviä glykoproteiineja.¹⁸ Koska grafeenimateriaalien vuorovaikutukset ympäristön aineiden kanssa riippuvat näiden varauksista ja täten ympäristön pH-arvosta: voidaan eri kudosten ja solujen osien vaihtelevien pH-arvojen myös puoltavan grafeenimateriaalien vaikutusten ympäristöriippuvuutta.¹⁸ Yhtenä mahdollisena kohdekudoksena voidaan mainita hermoradat: esimerkiksi biopohjaisilla

polymeereillä funktionalisoidun grafeenin on todettu jättävän hermosolujen ja niiden osien normaalin toiminnan ennalleen toimiessaan bioyhteensopivana elektrodina tai elektronisena komponenttina muun muassa joustavuutensa ansiosta.^{39,71} Lisäksi myös ”puhtaiden” grafeenipintojen on todettu toimivan mainiona kasvualustana hermoradoille.⁴⁶

Hyvänä puolena grafeenimateriaalien kudoksiin rikastumisesta voidaan mainita PEGyloidun grafeenioksidin taipumus kertyä korkean aineenvaihdunnan kudoksiin, kuten syöpäsoluihin ja maksaan.^{18,24} Erityisesti syöpäsoluihin rikastuminen on hyödyksi, koska biopolymeereihin (kuten polyetyleeniglykoliin) voidaan sitoa lääkeaineita ja fluoresoivia ryhmiä, joita voidaan käyttää esimerkiksi kasvainten tuhoamiseen.²⁴ Fluoresenssiryhmien vuorovaikutusten on todettu muutenkin olevan sovellettavissa grafeenimateriaalien kanssa: adaptereilla, kuten NHS-PYR-kuvioinnilla, liitetyt fluoresenssiryhmät eivät vaimene yhtä paljon tai sammu, kuten suoran adsorbtiion tapauksessa, ja grafeenioksidin aromaattisiin alueisiin sitoutuviin pyreenin tapaisiin laajoihin aromaattisiin levymolekyyleihin voidaan liittää syklinen RGD-tripeptidi etäisyydelle, joka integriineihin sitoutuessaan auttaa aromaattista levymolekyyliä irtoamaan grafeenioksidin pinnasta ja palaamaan fluoresoivaksi.^{22,24} Fluoresoivia ryhmiä voidaan myös hyödyntää suoraan adsorboitujen biomolekyylien yhteydessä.^{18,24} Toisin kuin nukleiniemäsjuosteet (DNA, RNA), grafeenin pintaan suoraan adsorboidut polypeptidit (proteiinit) eivät ole turvassa restriktioentsyymeiltä, jotka leikkaavat haluttuja kohtia peptidisekvensseistä, mikä voi irrottaa fluoresoivan ryhmän adsorboivan grafeenimateriaalin pinnan läheisyydestä ja kumota fluoresenssin sammutuksen.^{18,24}

Yksijuosteiset nukleiniemässekvenssit (RNA, ssDNA ja proteiineihin liittyvät aptameerit) sitoutuvat toiminnallisuuttaan menettämättä grafeeniin tai grafeenioksidin hapettumattomiin alueisiin aromaattisista emäksistään π - π -vuorovaikutuksilla, toisin kuin kaksijuosteinen dsDNA, jonka kaksoiskierteen vastakkaiset fosfaattideoksiriboosijuosteet piilottavat tämän emäsosat muodostamansa kaksoiskierteen väliin.^{18,24,27,35} Koska aptameerit ja ssDNA sitoutuvat heikommin grafeenimateriaalin pintaan kuin vastinjuosteeseensa tai -proteiiniinsa, ne irtoavat pinnasta vastinbiomolekyylin ollessa läsnä, mikä samalla poistaa grafeenimateriaalin aiheuttaman sammutuksen mahdollisissa fluoresoivissa ryhmissä.¹⁸ Tätä ilmiötä voidaan lämpötilan nousun ja yksijuostesekvenssien konsentraation mittaamisen ohella käyttää hyväksi biomolekyylien fluoresenssimittauksissa.¹⁸ Lopuksi mainittakoon, että grafeenioksidiin kovalenttisesti liitetty ssDNA ei välttämättä menetä toimintakykyään, kuten eivät myöskään grafeenioksidin pintaan adsorboidut kuljetusmerkkipeptidisekvenssit.²⁴

4 Grafeenimateriaalien karakterisointi ja sovellukset

Grafeenia ja sen johdannaisia voidaan soveltaa muun muassa energiantuotannon, lääketieteen, analytiikan ja elektroniikan alalla.^{14,18,24,27,35,36,38,39} Nämä sovellukset kuitenkin vaativat karakterisointia, joka voidaan suorittaa erillisillä mikroskopian ja spektrometrian muodoilla.^{3,11,14,43–45,72}

4.1 Grafeenimateriaalien ja funktionalisoitujen grafeenimateriaalien karakterisoinnista

Grafeenimateriaalipintoja voidaan karakterisoida tarkemmin atomivoimamikroskopiolla (AFM : **A**tom **F**orce **M**icroscopy), Raman spektrometrialla, infrapunaspektrometrialla, sekä erillisillä elektronivirtoihin perustuvilla mikroskopian muodoilla kuten: pyyhkäisyelektronimikroskopiolla (SEM : **S**canning **E**lectron **M**icroscopy), läpäisyelektronimikroskopiolla (TEM : **T**ransmission **E**lectron **M**icroscopy) ja tunnelointivirtamikroskopiolla (STM : **S**canning **T**unneling **M**icroscopy).^{3,11,14,43–45,72} Edellä mainittuja yksinkertaisempi ja mahdollisesti alustavana käytettävä grafeenipintojen karakterisointikeino on ”täyttä” valkoista valoa käyttävä optinen mikroskopia.⁴³

Valomikroskopiassa kaikki aallonpituudet sisältävä valo kohdistetaan grafeenilastuun ja tämän kiinnityspintaan, joka on mieluiten ~300 nm tai ~100 – 90 nm paksuista piioksidia (SiO₂), koska tällöin voidaan havaita myös ohuimmat kerrostumat.⁴³ Mitattavasta pinnasta palaavan valon määrästä ja aallonpituuksien kontrastimuutoksista voidaan arvioida grafeenikerrosten määriä karkeasti.⁴³ Tämä kontrastin muutos voidaan havaita ~550 nm alueella kyseisten aallonpituuksien lisääntymisestä aina noin 10 kerroksen paksuuteen asti, jonka jälkeen edellä mainitulla aallonpituusalueella alkaa tapahtumaan häviämistä.⁴³

Raman spektrometriaa voidaan käyttää sekä ”puhtaiden”, että proteiineilla funktionalisoitujen grafeenimateriaalipintojen karakterisointiin.^{14,43,72,73} Pienten ja spesifisten grafeenipintojen elektronisen rakenteen tutkimiseen soveltuu niin sanottu mikro-Raman spektrometria, jossa Raman-mittauksessa käytettävää laser-sädettä (~400 – 700 nm) kohdistetaan optisella mikroskoopilla esimerkiksi piioksidipintaan sijoitettuun näytteeseen.⁴³ Grafeenimateriaalien rakenneominaisuuksia karakterisoidessa täytyy kuitenkin ottaa huomioon signaalipiikkien siirtyminen lämpötilan funktiona sitä enemmän mitä vähemmän kerroksia näytteessä on: esimerkiksi yksikerroksisessa grafeenissa G-piikki siirtyy $-(1,62 \pm 0,20) \cdot 10^{-2} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, kun kaksikerroksisessa siirtymä on vain $-(1,54 \pm 0,06) \cdot 10^{-2} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.⁷²

Ramanissa nähtävistä signaaleista niin sanottu D-piikki, jonka havainnointi kertoo elektronisesti ja tätä kautta rakenteellisesti epäpuhtaasta grafeenipinnasta, sijaitsee aaltoluvulla $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$.^{14,43,72} Grafeenioksidissa tämä piikki on luonnollisesti huomattavan intensiivinen, kuten luvuissa 2.1 ja 2.2 esitellyn perusteella voidaan olettaa.⁴³ Toinen yleisesti havaittava signaali on niin kutsuttu sp^2 -sidovärihdyksistä johtuva G-piikki, joka sijaitsee grafeenissa aaltoluvulla $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$, mutta siirtyy grafeenioksidissa hiukan aaltolukuun $\sim 1590 \text{ cm}^{-1}$ ja levenee.^{14,43,72-74} Grafeenin vyörakenteen häirintä sähkökentällä on havaittavissa selvästi G-piikin vahvistumisesta ja vaelluksesta yläkenttään (suurempaan aaltolukuun).⁷⁴

G-piikkiä voidaan käyttää grafeenin molekyyliarakenteen virheiden arviointiin vertailemalla tätä D-piikkiin, minkä lisäksi grafeenimateriaaliin adsorboituneet peptidit voidaan havainnoida tästä piikistä leventymänä.^{14,73} Peptidien adsorboituminen leventää G-signaalia, koska peptidisekvensseistä löytyvien amidien signaalit ”amidi I” ($\sim 1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) ja ”amidi II” ($\sim 1570 - 1520 \text{ cm}^{-1}$) sekoittuvat G-signaaliin, leventäen sitä.⁷³

Grafeenimateriaalien kerrospaksuuksia voidaan havainnoida niin sanotusta 2D-signaalista, jonka piikki ilmenee aaltoluvulla $\sim 2700 \text{ cm}^{-1}$.^{14,43,72,74} Grafeenikerrosten lukumäärää voidaan arvioida 2D-piikin muodosta aina noin viiteen kerrokseen asti, kun yksittäisestä kerroksesta nähtävä todella intensiivinen ja terävä piikki heikkenee ja levenee kerrosmäärän kulkiessa kohti grafiittia, jolloin esille saattaa ilmestyä myös selvähkö olkapää levenneeseen piikkiin.^{14,43,74} Grafeenioksidissa 2D-signaali vaimenee, kuten vyörakenteeltaan sähkökentän avulla doupatussa grafeenissa.^{43,74} Happiryhmien poistaminen, eli grafeenioksidin ajaminen –esimerkiksi lämpökäsittelyllä– kohti pelkistettyä grafeenioksidia palauttaa tämän signaalin intensiteettiä.⁴³ Sähkökentän aiheuttamasta elektronisesta muutoksesta mainittakoon, että se saa 2D-signaalin myös liukumaan hieman normaalilta aaltoluvultaan pois, kun käytetään tarpeeksi suurta jännitettä.⁷⁴ Raman spektrometriasta saatavaa 2D-piikin intensiteetin suhdetta G-piikin intensiteettiin voidaan Das, A.; *et al.* mukaan käyttää grafeenin douppautumisen havainnointiin.⁷⁴

Grafeenioksidin funktionaalisia ryhmiä voidaan tutkia infrapunaspektrometrian keinoin (ATR –/FTIR), mutta tällä voidaan myös tarvittaessa karakterisoida polypeptidien adsorptiossa muuttuvia –eroavia– rakenteita.^{26,73} Lisäksi edellä esitelty G-piikin muokkaus amidi I:n ja amidi II:n voidaan havaita infrapunaspektristä.⁷³

AFM soveltuu hyvin paljaiden, sekä proteiineilla ja kokonaisilla soluilla (esimerkiksi hermoilla) funktionalisoitujen grafeenimateriaalipintojen tarkempaan kuvantamiseen ja näiden mekaanisten ominaisuuksien karakterisointiin hyvin.^{3,11,14,22,23,26,43-46}

Atomivoimamikroskopiaa voidaan suorittaa tällöin kolmella eri tavalla: ensimmäisellä näistä saadaan aikaan nopeita, mutta melko raakoja kuvia ajamalla mikroskoopin neulan alle 10 nm levyistä päätä alle puolen nanometrin päässä mitattavasta pinnasta, jolloin näiden väliset van der Waalsin vuorovaikutukset hylkivät neulaa pinnasta, mikä johtaa vääntymiseen neulaa pitelevässä vipuvarressa, mistä pinnan muotoja voidaan tulkita.^{43,44} Tämä voi tosin painaa tutkittavaa pintaa hiukan kasaan.⁴⁴ Tätä seuraava, hieman tarkempi ja hitaampi tapa perustuu neulan väräyttämiseen vakiotaajuudella 0,5 – 2 nm päässä tutkittavasta pinnasta, jolloin pinnanmuodot selvitetään vipuvarren vääntymisestä, kun neulan kärki ottaa hetkellisen ”kontaktin” pinnasta.⁴³ Kolmas, hitain, mutta tarkin tapa suorittaa atomivoimamikroskopiaa kosketusherkille näytteille perustuu myös värähtelyyn.⁴³ Tässä neulanpää asetetaan värähtelemään neulan resonanssitaajuutta korkeammalla taajuudella 1 – 10 nm päähän tutkittavasta pinnasta, jolloin pinnan lähestyminen pakottaa vuorovaikutuksillaan neulan värähtelyn kohti resonanssitaajuutta, jonka perusteella pinnan topografia voidaan ratkaista ilman, että neula koskee karakterisoitavaan pintaan.⁴³ Toisin kuin pintaa koskettavissa tapauksissa: tämän tiedetään vetävän pintaa kohti itseään.⁴⁴

Grafeenioksidin pinnan happiryhmät tekevät siitä paksumpaa (~1 nm tasaisimmillaan)²⁶ kuin puhtaasta grafeenista, mutta grafeenin tavoin sekin pyrkii asettumaan erillaisten pintojen mukaan, minkä vuoksi valittu kiinnitysmateriaali vaikuttaa atomivoimamikroskopiasta saataviin tuloksiin.^{43,44} Piioksidin kiinnittäminen on helpompaa, mutta grafeenimateriaalit asettuvat tämän epätasaisempaan pinnan mukaan lisäten poimuttuneisuutta, kun tasaiseen kiillepintaan kiinnitetty grafeenimateriaali on taas tasaisimmillaan, mutta tällöin täytyy myös ottaa huomioon pintoihin kiinnityksen grafeenimateriaaleista poimuja poistava vaikutus.^{43,44} Edellä mainitut seikat on huomioitava, kun mitataan esimerkiksi proteiinikuviointia grafeenipinnassa, koska grafeenimateriaaleihin (esimerkiksi kemiallisilla ja biologisilla adaptereilla, sekä esimerkiksi grafeenioksidin tapauksessa suoraan) kiinnitettyjen proteiinien aiheuttamia topografisia muutoksia voidaan mitata atomivoimamikroskopialla.^{22,23,26} Tarvittaessa tällä tavoin voidaan kiinnittymistä seurata reaaliaikaisesti.²⁶ Atomivoimamikroskoopin neulanpäättä voidaan myös käyttää koettimena grafeenimateriaalien mekaanisten ominaisuuksien mittaamisessa, eli toisin sanoen neulalla tökitään tutkittavaa näytettä ja vipuvarren väännöstä ja jousivoimista selvitetään näytteen vastetta tälle manipulaatiolle.^{14,45}

Tunnelointivirtamikroskopiolla voidaan myös tutkia grafeenimateriaalien pinnanmuotoja, mutta tämän käyttökohteet rajoittuvat vain johtaviin materiaaleihin, kuten puhtaaseen grafeenipintaan.^{3,14,43} Tunnelimikroskopiaa voidaan suorittaa joko vakiovirtaisena, jolloin

skannausneulan etäisyyttä muutetaan tutkittavasta pinnasta ja etäisyyden muutoksesta luetaan pinnan topografia, tai skannausneulan etäisyys voidaan pitää vakiona ja pinnanmuotoja tulkita muuttuvasta tunnelointivirrasta.⁴³ Lisäksi mahdolliset eristävät (ja ei eristävät) reagenssi-, sivutuote- ja avustusainejäämät voivat estää grafeenimateriaalipinnan aidon topografian/kuvioinnin näkymisen (kuten atomivoimamikroskopiassa) minkä vuoksi pinnan mahdollinen puhdistus täytyy ottaa huomioon mahdollisena esikäsittelynä.³ STM-näytteen mittaaminen eristepinnoilla takaa pelkästään itse näytteen näkymisen, mutta useat eristeet (kuten esimerkiksi piioksidi) voivat kuitenkin epätasaisuudellaan poimuttaa grafeenimateriaalinäytettä lisää ja näin häiritä mittausta.⁴³

Grafeenipintoja voidaan kuvata myös pyyhkäisyelektronimikroskopialla ja läpäisyelektronimikroskopialla, joiden yksi etu on grafeenin syntymisen kuvaaminen esimerkiksi CVD:llä reaaliajassa.¹⁴ SEM-mittauksissa näytettä pommitetaan elektroneilla, jolloin näytteestä lähtevästä toisioelektroniemissiosta muodostetaan kuva, jonka resoluutiolla voidaan erotella muun muassa näytteen kiteiden mittasuhteita erinomaisella tarkkuudella.⁴³ TEM-mittauksissa –tarkempia– resoluutioltaan jopa alle nanometrin (1 – 2 Å) tarkkoja kuvia muodostetaan näytteen läpi ammutun elektronisäteen sironnasta.⁴³ Tämä tarkkuus ylittää jo kertomaan pinnan ryhmien kiinnittymisestä, sillä TEM kykenee paljastamaan topografian lisäksi grafeenin hiilikennoston, minkä sidosten muutoksista voidaan havaita selvästi, onko kyseessä kemiallinen sitoutuminen tai jokin muu molekylaarinen virhe grafeenipinnassa.⁴³ Lisäksi erottuvasta hiilikennostosta voidaan arvioida grafeenimateriaalin paksuutta: kerrosmäärä lisää pinnalla erottuvien kuvioiden kontrastia ja on todettu, että pariton kerrosmäärä tuottaa kolmioita muistuttavia varjostuskuvioita, kun parillinen puolestaan tuottaa hiukan intuitiivisempia kuusikulmiomaisia varjostuskuvioita.⁴³ Mainittakoon, että elektronien diffraktiosta voidaan lisäksi tulkita grafeenin geometriaa poimuttuneisuuden ja latoutumisen suhteen.⁴³ Vaikka läpäisyelektronimikroskopia vaikuttaisi olevan kaikin tavoin soveltuvampi, kuin pyyhkäisyelektronimikroskopia, sillä on ominaisuus, joka täytyy ottaa huomioon: näytteen läpäisevä intensiivinen elektronisäde voi vahingoittaa näytettä mittausten aikana.⁴³ Vaikka tämä täytyy ottaa huomioon mahdollisesti uniikkeja näytteitä kuvantaessa, voidaan tätä käyttää hyödyksi: kuumennetusta grafeeninäytteestä voidaan kuvioiden poistaa esimerkiksi molekulaarisia virheitä ja ryhmiä TE-mikroskoopin elektronisäteellä.⁴³

Erityisesti grafeenimateriaalipintojen proteiineja ja muita biomolekyylejä kuvantaessa voidaan käyttää hyväksi fluoresoivia leimoja.^{18,22} Esimerkiksi välikappalemolekyyleihin liitetyt voidaan havaita suoraan fluoresenssista, minkä lisäksi grafeenipintojen fluoresenssia hiljentävää/sammuttavaa vaikutusta voidaan käyttää hyväksi biologisesti muunnellun

grafeenimateriaalin kuvantamisessa.^{18,22} Myös (poly)peptidien alttiutta restriktiolle grafeenimateriaalien hydrofobisilla pinnoilla voidaan myös käyttää karakterisoinnissa hyväksi: peptidiketjuun liitettyjä fluoresoivia sekvenssejä voidaan altistaa halutulle restriktioentsyymille, jolloin peptidistä irtoavan fluoresoivan palasen palautuvaa fluoresenssia voidaan mitata.¹⁸

Lopuksi vielä mainittakoon, että grafeenimateriaalien massan lisääntyminen, esimerkiksi biomolekyylien liittymisen seurauksena, voidaan määrittää näytteen liikevastuksen ja ominaisvärähtelytaajuuden muutoksista.^{27,28} Biomolekyylien liittyminen grafeenimateriaaliin lisää sen massaa, mikä lisää sen liikevastusta, mikä voidaan mitata laskevasta ominaisvärähtely-/resonanssitaajuudesta, eli ominaisvärähtelytaajuuden mittauksista voidaan tarvittaessa selvittää grafeenimateriaalien massoja.^{27,28} Alava, T.; Mann, J.A.; *et al.* ovat käyttäneet tätä hyväksi tutkimuksissaan^{27,28}, joissa (funktionalisoidun) grafeenin mittaukset on suoritettu kvartsikidemikrovaaka (QCM : Quartz – Crystal Microbalance).^{27,28}

4.2 Grafeenimateriaalien sovelluksista

Grafeenimateriaalien yksi huomiota herättävin ja ilmeinen sovellusala on elektroniikka.^{14,38} Grafeenin muutoksille herkän *zero-gap*-vyörakenteen vuoksi sitä voidaan douppata/rikastaa yksi- ja kaksikerrosgrafeenilevyistä puolijohteeksi todella hallitusti, mikä mahdollistaa muun muassa logiikkavirtapiireissä (esimerkiksi MOSFET:einä ja CMOS:eina) käytettävien seuraavan sukupolven kanavatransistorien (FET) valmistamisen, joiden ominaisuudet ylittävät nykyisen sukupolven (vm. ~2019) piipohjaiset verrokkit.^{14,38} Lisäksi grafeenia voidaan soveltaa uudenaikaisten yksittäiselektronitransistorien (SET : Single Electron Transistor) ja spintroniikkaan perustuvien komponenttien (esimerkiksi muisteissa) valmistuksessa.^{14,38} Elektroniikan alalla ehkä klassisin esimerkki grafeenin ylivoimaisuudesta on sen spekuloitu kyky sallia miniatyrisaation jatkuminen siitä, mihin se piipohjaisten piirien kanssa jää.³⁸ Tämän lisäksi grafeenista valmistetut puolijohteet sallivat entistä suuremmat ajo-/kellotaajuudet ja reaktiotaajuudet niistä valmistetuissa piireissä, sekä vähentävät virtahäviötä ja parantavat näiden kykyä sietää suuria virtoja.^{14,38} Vyörakenteensa vuoksi edellä esiteltyjen transistorien ominaisuuksia voidaan säätää valmistuksen yhteydessä esimerkiksi kerroslukumäärän ja grafeenin molekulaarisen rakenteen douppaamisen säätämällä, kun grafeenia valmistetaan esimerkiksi CVD:llä, jonka avulla voidaan tuottaa tarvittaessa valmiiksi douppattua grafeenia.^{14,36,38} Useampi kerros tuotetussa grafeenilevykerrastossa vaatii tosin huomattavasti voimakkaampaa muuntelua, jotta muutosta ominaisuuksissa saadaan aikaan.³⁸

Läpinäkyvyytensä ja erinomaisen johtokykynsä, sekä joustavuutensa vuoksi grafeenia voidaan lisäksi käyttää läpinäkyvissä elektrodeissa/johtimissa, sekä johtavissa pinnoitteissa: esimerkiksi aurinkokennot ovat yksi mahdollinen sovelluskohde.^{14,38} Näiden (verrattain korkeatehoisten) aurinkokennojen keräyspintoja voidaan myös valmistaa grafeenista.⁷⁵ Grafeenia ja klassisesti käytettyjä materiaaleja, kuten kultaa ja piitä, voidaan käyttää mikro- ja nanotasolla elektromekaanisten laitteiden ja komponenttien valmistamiseen.³⁸ Näitä todella tiiviisti pakattavia komponentteja voivat olla esimerkiksi kannatinpalkit (cantilever), joidenka asento reagoi lämpötilan muutoksiin, alkavat värähtelemään niiden läpi johdetun vaihtovirran ajamana tai muuttavat mittasuhteitaan esimerkiksi laser-kuumennuksen seurauksena.³⁸ Esimerkiksi edellä mainittua värähtelyä voidaan seurata muuttuvasta fotonisironnasta.³⁸

Grafeenimateriaalilevyjä voidaan käyttää myös suuremman mittakaavan rakenteissa ja sähköisissä komponenteissa.^{14,38} Grafeenin sovelluksia erilaisissa kondensaattoreissa ja litium-akuissa pidetään erinomaisina, koska niiden pinta-ala verrattuna muihin mittasuhteisiin (kaksiulotteisuus) on harvinaisen suuri.^{14,38} Grafeenimateriaalien käyttäminen rakennekomposiittien valmistuksessa herättää kiinnostusta, koska erilaisilla funktionalisoinneilla voidaan säätää grafeenin sekä muiden komposiitin komponenttien vuorovaikutuksia ja näin muuttaa komposiitin mekaanisia, sähköisiä ja termisiä ominaisuuksia.^{14,38} Parhaaksi tavaksi tuottaa polymeerikomposiitteja on todettu suorittaa polymerisointireaktiot grafeenimateriaalin ympärillä, mikä takaa tasaisen sekoituksen.¹⁴ Biosovelluksiin tämä liittyy siten, että grafeenimateriaaleista valmistettuja rakenteita voidaan käyttää kudosten ja solujen tukirakenteina ja kasvatusalustoina, joita voidaan säätää proteiinikuvioinnilla.^{18,24} Grafeenimateriaaleihin ja näiden komposiitteihin kuvioituja proteiineja voidaan soveltaa eräänlaisten molekylaaristen ”ahjojen” valmistamiseen: proteiineja ympäristön muutoksilta mahdollisesti vakauttavaan grafeenimateriaalipintaan voidaan kuvioida halutuille reaktioille (ja reaktiosarjoille) nanokatalyysilaitteistoja.^{24,35}

Grafeenimateriaaleja, erityisesti grafeenioksidia, voidaan myös käyttää aineiden hallittuun kuljetukseen.^{18,24,35} Grafeenimateriaaleihin voidaan adsorboida muun muassa lääkkeitä: esimerkiksi niihin ennalta funktionalisoiituihin biopohjaisiin polymeereihin, kuten polyetyleeniglykoliin.^{18,24,35} Tämä esimerkiksi sallii hydrofobisten lääkkeiden kuljetuksen polaarissa ympäristöissä, mikä on hyödyllistä erityisesti syöpälääkkeiden kohdalla, koska esimerkiksi PEGyloitu grafeenioksidi rikastuu aineenvaihdunnallisesti ylikierroksilla käyviin syöpäsoluihin.^{18,35} Erilaisten kudosten ja soluelimien eroavia pH-arvoja voidaan myös käyttää hyväksi lääkkeiden kohdistettuun vapauttamiseen, minkä lisäksi grafeenimateriaalien jo valmiiksi hyviä molekyylinkuljetusominaisuuksia voidaan tehostaa vielä edelleen lisäämällä

tuotettujen grafeenimateriaalikomposiittien pintoihin solujen reseptoreihin selektiivisesti assosioituvia antigeenejä/vasta-aineita.¹⁸ Lisäksi PEGyloituja grafeenimateriaaleja voidaan kuumentaa myös solujen sisällä infrapuna-laserilla, joka mahdollistaa (syöpä)solujen keittämisen elävältä.^{18,24} Lisäksi soluihin tunkeutuvan grafeenioksidin funktionalisointia geenivektoriksi tutkitaan.³⁵

Grafeenimateriaalit soveltuvat ominaisuuksiltaan hyvin erilaisiin sensoreihin.^{14,18,24,27,35,36,38,39} Grafeeni ja pelkistetty grafeenioksidi voivat jo itsessään toimia sähköisinä sensoreina, koska niiden vyörakenteet ovat herkkiä ympäristön vuorovaikutuksille ja tätä kautta ympäristön muutoksille.^{14,38} Grafeenioksidin sovellukset sensoreissa vaativat sen liittämisen osaksi muihin komponentteihin, jotka reagoivat sen muutoksiin.³⁸ Ilmakehän koostumuksen muutoksia (esimerkiksi kaasukoostumusta ja kosteutta) voidaan mitata sen kanssa kosketuksiin joutuvien pelkistyneempien grafeenimateriaalien johtavuuksien muutoksista, kun grafeenioksidin tapauksessa puolestaan pinnan hygroskooppiset happiryhmät saavat grafeenioksidin turpoamaan imiessään kosteutta itseensä, mikä voidaan lukea esimerkiksi pietsosähköisellä sensorilla.^{14,38} Lisäksi grafeenimateriaalien vuorovaikutusta muiden aineiden fluoresenssin kanssa voidaan käyttää sensori- ja mittaustarkoituksissa.^{18,24,35} Tämä perustuu grafeenimateriaalien kykyyn sammuttaa niiden pinnan läheisyyteen assosioituvien fluoresenssiryhmien fluoresenssi, joka palautuu, kun fluoresoiva ryhmä etäännyy pinnasta.^{24,35} Tämän avulla voidaan havainnoida ja mitata proteiinien alayksiköiden irtoamista muusta proteiinista esimerkiksi adsorboidun polypeptidisekvenssin entsyymäattisen restriktion yhteydessä, sekä liuoksissa tai soluissa vapaana olevia yksijuostepolypeptidisekvenssejä (esimerkiksi ssDNA ja mRNA) ja proteiineja, kun grafeenimateriaalien pintoihin adsorboidut vastinjuosteet ja aptameerit dissosioituvat pinnasta assosioituakseen vastinnukleotideihinsä ja -peptideihinsä.^{18,24,35} Mainittakoon tosin, että erilaisilla (muita aineita sitovilla) (bio)molekyyleillä kuvioituja grafeenimateriaaleja voidaan käyttää muiden biomolekyylien, solujen ja virusten kuvioituun ”pyydystämiseen” jatkotutkimuksia varten.³⁵

Grafeenista voidaan valmistaa todella selektiivisiä biomolekyyლისensoreita funktionalisoimalla siihen selektiivisesti ligandeja, kuten antigeenejä, proteiineja ja jopa soluja, sitovilla biomolekyyleillä, kuten vasta-aineilla (Ig) ja entsyymeillä.^{24,27,35,36} Grafeeni voi toimia tällöin joko pelkästään mahdollisista hapetus/pelkistysreaktioista syntyvää elektronivirtaa välittävänä elektrodina, tai jopa vahvistimena/herkkyys säätimenä, mikäli reseptoribiomolekyylit liitetään grafeenista valmistettuun kanavatransistoriin (FET).^{35,36,39} FET-sensorin ominaisuuksia voidaan säätää etujännitteellä säädettävän sähkökentän lisäksi muun muassa muuttamalla siihen käytettävän grafeenin vyöaukkoa douppaamalla.³⁶ Vasta-aineita/immunoglobuliineja (Ig)

käytettäessä aineiden sitomiseen/tunnistamiseen, voivat sidottavat aineet kuitenkin jäädä pysyvästi kiinni sensoriin, mikä haittaa sensorin reaktiokykyä jatkuvissa ja reaaliaikaisissa mittauksissa.³⁵

Tukimateriaaliin (esimerkiksi polymeerikomposiittiin) tuettujen, grafeeniin tai pelkistettyyn grafeenioksidiin kiinnitettyjen, entsyymien hapetus/pelkistysreaktioista alun perin johtuvat elektronivirrat/potentiaalierot voidaan johtaa grafeenista mittalaitteisiin jatkokäsittelyä ja analysointia varten.³⁵ Tälle voidaan esitellä kaksi hiukan, mutta selvästi, eroavaa reittiä: grafeenipintakatalysoidun ”välityshapetus/pelkistysreaktion” kautta tapahtuva varauksensiirto, sekä tutkimusten alla oleva (mahdollisesti tehokkaampi ja vähähäiriöisempi) suora varauksensiirto entsyymien reaktiokeskuksista.³⁵ Viimeksi mainitun suoran varauksensiirron mahdollisuutta –entsyymistä grafeeniin ja tätä pitkin aina mittalaitteistoon asti– tutkitaan muun muassa piparjuuren peroksidaasille (HRP), koska sen katalyyttinen aktiivisuus (ja tätä kautta varauksensiirto) perustuu hemi-prosteettiseen ryhmään.³⁵ Suoran varauksensiirron toivotaan tapahtuvan entsyymien katalyyttisestä prosteettisesta ryhmästä suoraan grafeenin pintaan, jos tämä saadaan paljastettua grafeenin sähköä johtavalle pinnalle ilman, että entsyymien toimintakyky menetetään.³⁵ Ensimmäisenä mainitusta, entsyymien katalysoiman reaktion jälkeisestä, grafeenipinnalla tapahtuvasta varauksensiirtoa välittävästä reaktiosta voidaan antaa esimerkkinä grafeenipintaan kiinnitettyjen glukoosioksidaasien (esimerkiksi GOD ja Gox) yhteydessä tapahtuvat reaktiot.³⁵ Esimerkiksi (glukoosin havainnointiin jo edellä kuvaillusti käytetty, polymeeritukimateriaalissa grafeenin pintaan funktionalisoitu) GOD tuottaa katalysoimansa hapetusreaktiosarjan yhteydessä vetyperoksidia (H_2O_2), jonka voidaan ajatella katalysoituvan grafeenipinnalla hapeksi (O_2), kahdeksi protoniksi (H^+) ja kahdeksi elektroniksi (e^-), jotka siirtyvät mitattavana varauksena grafeenia pitkin mittalaitteisiin.³⁵

Grafeenirakenteisiin kanavatransistoreihin liitettyjen entsyymien ja vasta-aineiden käytöstä on saatu lupaavia tuloksia esimerkiksi glukoosin mittaamisessa.³⁶ Tässä tapauksessa ympäristön muutoksia (kuten glukoosin pitoisuuksia) tarkkaillaan entsyymien katalysoimien/indusoimien reaktioiden/reaktiosarjojen ja lähistölle sidottujen biomolekyylien aiheuttamista muutoksista kanavatransistorin (FET) sähköisissä ominaisuuksissa.³⁶ Viswanathan, S.; *et al.* tutkivat ja esittävätkin näiden käyttöä seuraavan sukupolven käyttäjätystävällisemmissä ja tarkemmissä ”hoitopaikkalaitteissa” (POC device : **P**oint – **O**f – **C**are device) julkaisussaan.³⁶

Grafeenilevyjen funktionalisointi (entsyymeillä bio)polttokennojen reaktiolevyjen tuottamiseksi on herättänyt kiinnostusta, koska näitä voidaan latoa tiiviisti, sekä niiden laajaan

pinta-alaan voidaan pakata suuria määriä entsyymejä ilman, että niiden erinomainen johtavuus menetetään.^{35,38} Näiden grafeenista tuotettujen polttokennojen (EBFC : Enzyme – Based Biofuel Cell) on todettu olevan ominaisuuksiltaan hyvälaatuisia verrattuna esimerkiksi muista klassista ja hiilinanomateriaaleista valmistettuihin, vaikka grafeenista valmistettujen pinta-alakohtainen tehonanto (power density) voi olla vain noin $24 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ja elinikä vain noin viikon, johtuen entsyymien luonnollisesta toimintakyvyn katoamisesta.³⁵ Entsyymien ”vanhenemisen” välttämiseksi näissä kennoissa voidaan reaktiolevyillä kasvattaa muuntogeenisiä soluja, kuten hiivoja, joiden luonnostaan uudistuvat pintaproteiinit on muunneltu haluttujen entsyymien kaltaisiksi.³⁵ Tällaisten esimerkiksi johtavissa grafeenioksidipohjaisissa hydrogeeleissä viljeltävien hiivakasvustojen etuina olisi itsekorvautuvan pinnan lisäksi mahdollisten polttoaineiden ja sivutuotteiden täysi poiskulutus, sekä muokkaus.³⁵

Yksi tapa valmistaa tällaisia polttokennoja on kytkeä hapettavan ja pelkistävän entsyymin metaboliittikierrat yhteen siten, että näiden reaktioissa syntyvät ja kuluvat aineet voivat kiertää eristävän väliaineen kautta vastakkaisten entsyymien/elektrodien välillä samalla, kun virta voi kulkea ainoastaan grafeenin näihin yhdistämien elektrodien ja johtimien kautta.³⁵ Käytännössä tämä tarkoittaa muodostettavassa polttokennossa anodin liittämistä (elektroneja reaktiosarjallaan tarjoavaan) hapetusentsyymeillä (esimerkiksi glukoosioksidaaseilla) funktionalisoituun grafeenilevykomposiittisysteemiin ja katodin liittämistä grafeenilevy/entsyymikomposiittiin, joka kuluttaa katodille saapuvia elektroneja pelkistystä ajavassa reaktiosarjassaan.³⁵ Glukoosioksidaasikomposiittianodien tapauksessa katodin grafeenikomposiittiin voidaan funktionalisoida vaikka (bilirubiini)oksidaasia, joka pelkistää anodin glukoosioksidaasin ja grafeenin katalyysireaktioissa syntyvää happea (O_2).³⁵ Tällaisten polttokennojen voidaankin ajatella olevan eräänlaisia keinotekoisia aineenvaihduntakiertoja sekoitettuna akkumaiseen rakenteeseen.

Sokereja, rasvoja ja muita vastaavia energianlähdemolekyylejä (joita esiintyy myös elävissä organismeissa) hapettavia polttokennoja suunnitellaan apuimplanteiksi muille virtaa tarvitseville implanteille, kuten insuliinipumpuille ja erilaisille tahdistimille.³⁵ Tämä on kätevää ja käytännöllistä, kun huomioidaan, että grafeenia ja sen johdannaisia voidaan käyttää ihmisen ja koneen yhdistämiseen hermo/kone-rajapinnoissa.^{39,46,71}

Grafeenipohjaiset hermorajapinnat soveltuvat hyvin fysiologiseen ympäristöön, koska niitä voidaan muovata helposti, ne johtavat sähköä hyvin, sekä hermoratojen ja -solujen on todettu kasvavan grafeenin pinnalla sitä paremmin, mitä hydrofobisempaa grafeenipinta on, ilman että

ne menettävät toimintakykyään.^{46,71} Yksiä suurimpia syitä siihen, miksi grafeenipohjaiset hermoliitokset (esimerkiksi elektrodit) eivät laukaise hylkivää immuunivastetta, on niiden joustavuus verrattuna esimerkiksi metallisiin elektrodeihin, sekä grafeenipinnan kemiallinen stabiilius eli sen reagoimattomuus fysiologisessa ympäristössä.^{39,71} Grafeenista valmistettujen neuroimplanttien on todettu olevan laukaisematta immuunivastetta rottien aivoissa.³⁹ Grafeenia suunnitellaankin käytettävän eräänlaisina neurologisina ”käynnistyskaapeleina” lopullisesti lunastuskuntoon menneiden hermokudosten ohittamiseen.⁷¹ Esimerkiksi Blaschke, B.M.; *et al.* ovat onnistuneet lukemaan rottien aivosignaaleja suoraan hermoista SGFET:eillä (Solution Gated Field Effect transistor tai Electrolyte Gated Field Effect transistor), joissa hermosignaali vahvistuu luettavaksi sähköiseksi signaaliksi, kun hermojen kemiallinen signaali päättyy SGFET:ien elektrolyyttiin, johon säädettävä etujännite luo muun muassa vahvistusta säätelevän sähkökentän.³⁹

5 Lopputulokset ja yhteenveto

Kaikesta aikaisemmin esitetystä voidaan todeta, että grafeenista on moneksi: sille näyttäisi olevan käyttöä hyvin kirjavissa kohteissa. Lääketieteessä ja bioteknologiassa sen soveltavuus bioanalytiikkaan/-sensoreihin,^{14,18,24,27,35,36,38,39} lääkkeenkuljetukseen,^{18,24,35} sekä rakenne-^{18,24} ja konerajapintakomponenteissa^{39,46,71} vaikuttavat aiemmin kuvaillun (ja käytettyjen lähteiden) perusteella lupaavalta. Grafeeni näyttäisi soveltuvan erityisesti implanteihin ja aineenvaihdunnan tarkkailuun, joilla voidaan parantaa esimerkiksi diabeetikkojen³⁶ elämänlaatua. Erityisesti ihmiseen sovellettaessa, proteiinien ja grafeenimateriaalien vuorovaikutusten tunteminen ja soveltaminen (erityisesti funktionalisointi) tulee olemaan kirjaimellisesti elintärkeää, kuten koko aiemmasta tekstistä lähteineen voidaan ymmärtää.

Koska proteiinien rakenne määrää niiden bioaktiivisuuden^{20,30–33,59} ja tämä rakenne voidaan selvittää NMR-spektrometrialla,⁶⁶ voinee ¹H-NMR olla yksi soveltuvimmista tavoista tutkia puhtaan grafeenipinnan proteiineja. Tämä sen vuoksi, että puhtaassa –täydellisessä– grafeenipinnassa ei ole ideaalisesti vetyä liittyneenä, vaan kaikki hiilet ovat sitoutuneena toisiinsa.^{1–5}

Yleinen ympäristön^{14,38} ja biologisten aineiden^{18,24,35} mittaaminen tulee melko varmasti levittämään grafeenimateriaaleja kaikkialle, missä ympäristön ja biofilmien tarkka hallinta ja seuranta on elintärkeää: esimerkiksi elintarvike- ja yhdyskuntatekniikan saralla. Esimerkiksi värähteleviä nanoskooppisia tukivarsia³⁸ voitaisiin käyttää rakenteiden ja litosfäärin mekaanisen vakauden ja värähtelyn seuraamiseen, teoriassa. Lisäksi erilaisten pintojen, kuten

esimerkiksi suojakerrosten (sähköjohtojen kuorien, säiliöiden ja rakenteiden) yhtenäisyyttä/halkeilua voisi myös olla mahdollista seurata näihin upotetuilla (läpinäkyvillä) elektrodeilla/johtimilla, joita grafeenista voidaan valmistaa.^{14,38} Rakenteiden halkeilu melko varmasti katkaisee johtavat grafeenijohtimet rakenteessa, minkä pitäisi olla sähköisesti havaittavissa jopa silloinkin, kun halkeilua ei tapahdu pinnalla.

Grafeenin leviämisen arkikäyttöön takaa todennäköisesti myös sen soveltuvuus elektronisissa^{14,38} ja elektromekaanisissa³⁸ komponenteissa, sekä erilaisissa komposiittimateriaaleissa^{14,38}. Tämän muun muassa kuluttajien keskuuteen leviäminen –grafeenin aktiivisen elimistöön tuonnin lisäksi– mahdollistaa altistukset, kuten Sanchez, V.C.; *et al.* antava vahvasti ymmärtää julkaisussaan,¹⁸ missä grafeenimateriaalien vuorovaikutusten tuntemista ja tutkimista biologisten systeemien (muun muassa proteiinien) kanssa korostetaan.¹⁸ Luan, B; *et al.* ja Hu, W.; *et al.* toteavat myös samaa julkaisuissaan.^{25,40} Esimerkkinä tähän vuorovaikutukseen kohdistetun tutkimuksen hedelmistä ovat huomiot siitä, että veriseerumit proteiineineen passivoivat grafeenimateriaaleja fysiologisesti haitallisilta reaktioilta,^{25,40} mikä puoltaa grafeenin käyttämistä elävien organismien sisällä.

Grafeenimateriaalien ja proteiinien erilaisten komposiittien (joita on kuvailtu tekstissä jo aiemmin) soveltuvuudesta ei näyttäisi olevan epäilystäkään, mutta erityisesti entsyymipohjaiset polttokennot (EBFC) ovat kiinnostavia. Pelkästään ennalta mainittujen implanttien voimanlähteenä toimimisen³⁵ lisäksi niitä voitaisiin käyttää esimerkiksi selluloosan hapettamiseen energiaksi, kuten myös biojätteen tapauksessa. Biojätteen hapettamisen yhteydessä myös lannoitteiden tuottaminen ja esimerkiksi fosforin sekä metallien talteenottoa voitaisiin tutkia. Edellä mainittu mikro-organismien käyttö tällaisten polttokennojen elektrodeilla³⁵ on ehkä soveltuvampaa kehon ulkopuolella käytettäviin –mahdollisesti teollisiin– polttokennoihin, kun otetaan huomioon yleistieto, että ihmisen immuunipuolustus ei normaalisti salli useallaisten vieraiden solujen olemassaoloa ihmisen elimistössä.

Ihmisen sisällä käytettäessä mahdollisten grafeenielektrodien entsyymattista aktiivisuutta voitaisiin pitkittää (ainakin teoriassa) käyttämällä pintaproteiineiltaan muunneltuja yksilön omia soluja tai solukkoja (minkä pitäisi auttaa immuunivasteen välttämiseksi). Näitä soluja voitaisiin pitää grafeenielektrodin läheisyydessä kovalenttisesti ankkuroiduilla polymeeriadaptoreilla, joidenka soluja sitovissa päissä olisi sidottuina joko integriinejä tai syklisiä RGD-päitä. Kokonaisten solukkojen tai kudosten sitominen saattaa myös olla käytännöllisempää, koska tällöin käytettävät solut kykenevät ehkä uudistumaan/korvautumaan paremmin, ilman että elektrodiin ankkurointi nousee ongelmaksi.

Suurimmaksi ongelmaksi kehonsisäisissä biopolttokennoissa tulee melko varmasti nousemaan väliaineiden valinta ja kennon sisustan pysyvä erottaminen muusta elimistöstä: mikäli kennon halutaan käyttävän kehon omia rasva-/sokerivarantoja täytyy sen olla avoin esimerkiksi verenkierrolle, mikä voisi ainakin periaatteessa altistaa elimistön muun muassa solujen ja entsyymien tukimateriaaleina käytettäville hydrogeeleille³⁵, muuntogeenisille soluille ja paljaille nanomateriaaleille. Lisäksi veren omien proteiinien aggregoituminen polttokennoon voi ehkä myös muodostua mahdolliseksi ongelmaksi. Teollisella tasolla entsyymipolttokennojen eduksi sähköntuotannossa voisi nousta, esimerkiksi selluloosaa polttaineena käytettäessä, mahdollinen hiilineutraalius. Toisin kuin öljy, jonka hiilivarannot ovat olleet verrattain kauan pois kierrosta, voidaan aktiivisessa käytössä olevasta hyötymetsästä otettavan hiilihydraatti-/biomassan ajatella olevan valmiiksi kierrossa ja näin vähintään melko hiilineutraalia.⁷⁶

Grafeenimateriaalien sovellukset hermo/konerajapinnoissa voivat ehkä myös hyötyä grafeenin kuvioinnista. Mikäli grafeenimateriaalia kuvioitaisiin soluja sitovilla biokomponenteilla ja hallitulla hapetuksella/pelkistyksellä siten, että jokaista esimerkiksi kanavatransistoria (FET) ympäröivä alue olisi muokattu hermosoluja sitovaksi (esimerkiksi integriineillä ja RGD-tripeptideillä) ja kaikki muut ympäröivät alueet hermosoluille epäsuotuisiksi: voitaisiin yksittäisiä hermoratoja liittää spesifisesti aina yksittäiseen tai useampaan kanavatransistoriin. Tämän etuna olisi hermosiganaalien parantunut eroteltavuus, koska yksittäisten transistorien sähköiset vasteet saataisiin yhdistettyä yksittäisten hermoratojen signaaleihin. Näiden hermoratojen adsorboiviin kohtiin (jokaista yksittäistä transistoria ja transistoriryöstä kohden) asettamista varten voitaisiin ehkä käyttää atomivoimamikroskooppia (AFM), jota voidaan käyttää nanokokoisten biologisten näytteiden manipulointiin ja vahingoittamiseen.^{77,78}

Lopuksi voidaankin kaikesta edellä esitetystä todeta, että grafeenimateriaaleilla on jo itsessään monia nopeasti laajenevia sovelluskohteita ja niiden funktionalisointi proteiineilla ja muilla biomolekyyleillä tulee vain lisäämään niiden käyttökohteita, sekä parantamaan niiden ominaisuuksia. Tämän biokuvioinnin/funktionalisoinnin tulee myös olla hallittua, jotta haluttuja ominaisuuksia voidaan säilyttää esimerkiksi entsyymejä liitettäessä. Tämän vuoksi grafeenimateriaalin valinta, proteiinin valinta ja muokkaus, sekä biomolekyylin funktionalisointi-/adsorbointimetodi tulee valita harkiten. Esimerkiksi: mikäli kohdeympäristön pH tiedetään, kun käytetään grafeenimateriaalina grafeenioksidia, tulee tässä vaiheessa miettiä voidaanko proteiineja funktionalisoida esimerkiksi heikoilla koordinaatiovuorovaikutuksilla vai täytyykö proteiinit liittää kovalenttisesti, jotta haluttu proteiinien pysyvyys saavutetaan. Lisäksi kuvioimalla näitä biomolekyylejä tietyillä tavoilla,

voidaan myös niiden (yhteis)vaikutuksiin ja ominaisuuksiin vaikuttaa. Tästä tulee melko varmasti olemaan hyötyä muun muassa suurempia supramolekulaarisia systeemejä luodessa, kuten esimerkiksi aiemmin mainitussa nanokatalyysissä. Loppujen lopuksi voidaan vielä kaikesta todeta, että grafeenin ja proteiinien välisten ja sisäisten vuorovaikutusten tunteminen ja hallinta tulee vaikuttamaan tulevaisuudessa suuresti bioteknologiassa, teollisuudessa ja lopulta arkielämässämme.

Lähteet

1. Mas-Ballesté, R.; Gómez-Navarro, C.; Gómez-Herrero, J. ja Zamora, F., 2D materials: to graphene and beyond, *Nanoscale*, **2011**, 3, 20–30.
2. Hirsch, A., The era of carbon allotropes, *Nat. Mater.*, **2010**, 9, 868–871.
3. Ishigami, M.; Chen, J. H.; Cullen, W. G.; Fuhrer, M. S. ja Williams, E. D., Atomic Structure of Graphene on SiO₂, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 1643–1648.
4. Wallace, P. R., The Band Theory of Graphite, *Phys. Rev.*, **1947**, 71, 622–634.
5. Schäffel, F., The Atomic Structure of Graphene and Its Few-layer Counterparts. Teoksessa: Warner, J. H.; Schäffel, F.; Bachmatiuk, A. ja Rummeli, M. H. (toim.), *Graphene : Fundamentals and Emergent Applications*, 1. painos, Elsevier, 2013, ss. 5–59.
6. Spyrou, K. ja Rudolf, P., An Introduction to Graphene. Teoksessa: Georgakilas, V. (toim.), *Functionalization of Graphene*, 1. painos, John Wiley & Sons, Incorporated, 2014, ss. 1–20.
7. Chung, D. D. L., Review: Graphite, *J. Mater. Sci.*, **2002**, 37, 1475–1489.
8. Geim, A. K., Graphene: status and prospects., *Science*, **2009**, 324, 1530–1534.
9. Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V ja Firsov, A. A., Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films., *Science*, **2004**, 306, 666–669.
10. Whitener, K. E. ja Sheehan, P. E., Graphene synthesis, *Diam. Relat. Mater.*, **2014**, 46, 25–34.
11. Novoselov, K. S.; Jiang, D.; Schedin, F.; Booth, T. J.; Khotkevich, V. V; Morozov, S. V ja Geim, A. K., Two-dimensional atomic crystals, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102, 10451–10453.
12. Ibrahim, I. ja Rummeli, M. H., Methods for Obtaining Graphene. Teoksessa: Warner, J. H.; Schäffel, F.; Bachmatiuk, A. ja Rummeli, M. H. (toim.), *Graphene : Fundamentals and Emergent Applications*, 1. painos, Elsevier, 2013, ss. 129–228.
13. Gerstner, E., Nobel Prize 2010: Andre Geim & Konstantin Novoselov, *Nat. Phys.*, **2010**, 6, 836–836.

14. Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J. W.; Potts, J. R. ja Ruoff, R. S., Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications, *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 3906–3924.
15. Georgakilas, V., Addition of Organic Groups through Reactions with Oxygen Species of Graphene Oxide. Teoksessa: Georgakilas, V. (toim.), *Functionalization of Graphene*, 1. painos, John Wiley & Sons, Incorporated, 2014, ss. 59–94.
16. Rondeau-Gagné, S. ja Morin, J.-F., Synthesis, functionalization and properties of fullerenes and graphene materials. Teoksessa: Leclerc, M. ja Gauvin, R. (toim.), *Functional Materials : For Energy, Sustainable Development and Biomedical Sciences*, De Gruyter, Inc., 2014, ss. 37–59.
17. Warner, J. H. ja Allen, C. S., Properties of Graphene. Teoksessa: Warner, J. H.; Schäffel, F.; Bachmatiuk, A. ja Rummeli, M. H. (toim.), *Graphene : Fundamentals and Emergent Applications*, 1. painos, Elsevier, 2013, ss. 61–127.
18. Sanchez, V. C.; Jachak, A.; Hurt, R. H. ja Kane, A. B., Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review, *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, *25*, 15–34.
19. Nair, R. R.; Blake, P.; Grigorenko, A. N.; Novoselov, K. S.; Booth, T. J.; Stauber, T.; Peres, N. M. R. ja Geim, A. K., Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene, *Science (80-.)*, **2008**, *320*, 1308–1308.
20. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Bender, K. S.; Buckley, D. H. ja Stahl, D. A., Molecular Microbiology. Teoksessa: *Brock Biology of Microorganisms, Global Edition*, 14. painos, Pearson Education Ltd, Harlow, 2015, ss. 131–163.
21. Rajesh, C.; Majumder, C.; Mizuseki, H. ja Kawazoe, Y., A theoretical study on the interaction of aromatic amino acids with graphene and single walled carbon nanotube, *J. Chem. Phys.*, **2009**, *130*, 124911.
22. Kodali, V. K.; Scrimgeour, J.; Kim, S.; Hankinson, J. H.; Carroll, K. M.; De Heer, W. A.; Berger, C. ja Curtis, J. E., Nonperturbative Chemical Modification of Graphene for Protein Micropatterning, *Langmuir*, **2011**, *27*, 863–865.
23. Wang, E.; Desai, M. S.; Heo, K. ja Lee, S. W., Graphene-Based Materials Functionalized with Elastin-like Polypeptides, *Langmuir*, **2014**, *30*, 2223–2229.
24. Spinato, C.; Ménard-Moyon, C. ja Bianco, A., Chemical Functionalization of Graphene

- for Biomedical Applications. Teoksessa: Georgakilas, V. (toim.), *Functionalization of Graphene*, 1. painos, Wiley-VCH, 2014, ss. 95–137.
25. Hu, W.; Peng, C.; Lv, M.; Li, X.; Zhang, Y.; Chen, N.; Fan, C. ja Huang, Q., Protein Corona-Mediated Mitigation of Cytotoxicity of Graphene Oxide, *ACS Nano*, **2011**, *5*, 3693–3700.
 26. Zhang, J.; Zhang, J.; Zhang, F.; Yang, H.; Huang, X.; Liu, H. ja Guo, S., Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization, *Langmuir*, **2010**, *26*, 6083–6085.
 27. Alava, T.; Mann, J. A.; Théodore, C.; Benitez, J. J.; Dichtel, W. R.; Parpia, J. M. ja Craighead, H. G., Control of the Graphene-Protein Interface Is Required To Preserve Adsorbed Protein Function, *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 2754–2759.
 28. Mann, J. A.; Alava, T.; Craighead, H. G. ja Dichtel, W. R., Preservation of Antibody Selectivity on Graphene by Conjugation to a Tripod Monolayer, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2013**, *52*, 3177–3180.
 29. Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; Ramesh, P.; Berger, C.; Sprinkle, M.; De Heer, W. A. ja Haddon, R. C., Chemical Modification of Epitaxial Graphene: Spontaneous Grafting of Aryl Groups, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1336–1337.
 30. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K. ja Walter, P., Proteins. Teoksessa: *Molecular Biology of THE CELL*, 6. painos, Garland Science, New York, 2015, ss. 109–172.
 31. Cox, M. M. ja Nelson, D. L., Amino Acids, Peptides, and Proteins. Teoksessa: *Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition*, 6. painos, Macmillan Higher Education, Basingstoke, 2013, ss. 75–114.
 32. Cox, M. M. ja Nelson, D. L., Protein Function. Teoksessa: *Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition*, 6. painos, Macmillan Higher Education, Basingstoke, 2013, ss. 157–187.
 33. Cox, M. M. ja Nelson, D. L., Enzymes. Teoksessa: *Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition*, 6. painos, Macmillan Higher Education, Basingstoke, 2013, ss. 189–242.
 34. Zhang, Y.; Wu, C.; Guo, S. ja Zhang, J., Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides, *Nanotechnol. Rev.*, **2013**, *2*, 27–45.

35. Pavlidis, I. V.; Patila, M.; Polydera, A. C.; Gournis, D. ja Stamatis, H., Immobilization of Enzymes and other Biomolecules on Graphene. Teoksessa: Georgakilas, V. (toim.), *Functionalization of Graphene*, 1. painos, Wiley-VCH, 2014, ss. 139–171.
36. Viswanathan, S.; Narayanan, T. N.; Aran, K.; Fink, K. D.; Paredes, J.; Ajayan, P. M.; Filipek, S.; Miszta, P.; Tekin, H. C.; Inci, F.; Demirci, U.; Li, P.; Bolotin, K. I.; Liepmann, D. ja Renugopalakrishnan, V., Graphene-protein field effect biosensors: glucose sensing, *Mater. Today*, **2015**, 18, 513–522.
37. Dragneva, N.; Floriano, W. B.; Stauffer, D.; Mawhinney, R. C.; Fanchini, G. ja Rubel, O., Favorable adsorption of capped amino acids on graphene substrate driven by desolvation effect, *J. Chem. Phys.*, **2013**, 139, 174711.
38. Robertson, A. W.; Warner, J. H.; Schäffel, F.; Rummeli, M. ja Ibrahim, I., Applications of Graphene. Teoksessa: Warner, J. H.; Schäffel, F.; Bachmatiuk, A. ja Rummeli, M. H. (toim.), *Graphene : Fundamentals and Emergent Applications*, 1. painos, Elsevier, 2013, ss. 333–437.
39. Blaschke, B. M.; Tort-Colet, N.; Guimerà-Brunet, A.; Weinert, J.; Rousseau, L.; Heimann, A.; Drieschner, S.; Kempski, O.; Villa, R.; Sanchez-Vives, M. V ja Garrido, J. A., Mapping brain activity with flexible graphene micro-transistors, *2D Mater.*, **2017**, 4, 025040.
40. Luan, B.; Huynh, T.; Zhao, L. ja Zhou, R., Potential Toxicity of Graphene to Cell Functions via Disrupting Protein-Protein Interactions, *ACS Nano*, **2015**, 9, 663–669.
41. Castro Neto, A. H.; Guinea, F.; Peres, N. M. R. R.; Novoselov, K. S. ja Geim, A. K., The electronic properties of graphene, *Rev. Mod. Phys.*, **2009**, 81, 109–162.
42. Kingsley, C. K.; Yeonchoo, C.; Vimlesh, C. ja Kwang, S. K., Noncovalent Functionalization of Graphene. Teoksessa: Georgakilas, V. (toim.), *Functionalization of Graphene*, 1. painos, John Wiley & Sons, Incorporated, 2014, ss. 199–217.
43. Bachmatiuk, A.; Schäffel, F.; Warner, J. H.; Rummeli, M. ja Allen, C. S., Characterisation Techniques. Teoksessa: Warner, J. H.; Schäffel, F.; Bachmatiuk, A. ja Rummeli, M. H. (toim.), *Graphene : Fundamentals and Emergent Applications*, 1. painos, Elsevier, 2013, ss. 229–332.
44. Lui, C. H.; Liu, L.; Mak, K. F.; Flynn, G. W. ja Heinz, T. F., Ultraflat graphene, *Nature*, **2009**, 462, 339–341.

45. Lee, C.; Wei, X.; Kysar, J. W. ja Hone, J., Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene, *Science* (80-.), **2008**, *321*, 385–388.
46. Li, N.; Zhang, X.; Song, Q.; Su, R.; Zhang, Q.; Kong, T.; Liu, L.; Jin, G.; Tang, M. ja Cheng, G., The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates, *Biomaterials*, **2011**, *32*, 9374–9382.
47. Balandin, A. A.; Ghosh, S.; Bao, W.; Calizo, I.; Teweldebrhan, D.; Miao, F. ja Lau, C. N., Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene, *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 902–907.
48. Morozov, S. V.; Novoselov, K. S.; Katsnelson, M. I.; Schedin, F.; Elias, D. C.; Jaszczak, J. A. ja Geim, A. K., Giant Intrinsic Carrier Mobilities in Graphene and Its Bilayer, *Phys. Rev. Lett.*, **2008**, *100*, 016602.
49. Bolotin, K. I.; Sikes, K. J.; Jiang, Z.; Klima, M.; Fudenberg, G.; Hone, J.; Kim, P. ja Stormer, H. L., Ultrahigh electron mobility in suspended graphene, *Solid State Commun.*, **2008**, *146*, 351–355.
50. Das Sarma, S.; Adam, S.; Hwang, E. H. ja Rossi, E., Electronic transport in two-dimensional graphene, *Rev. Mod. Phys.*, **2011**, *83*, 407–470.
51. Georgakilas, V., Covalent Attachment of Organic Functional Groups on Pristine Graphene. Teoksessa: Georgakilas, V. (toim.), *Functionalization of Graphene*, 1. painos, John Wiley & Sons, Incorporated, 2014, ss. 21–58.
52. Meyer, J. C.; Geim, A. K.; Katsnelson, M. I.; Novoselov, K. S.; Booth, T. J. ja Roth, S., The structure of suspended graphene sheets, *Nature*, **2007**, *446*, 60–63.
53. Hernandez, Y.; Nicolosi, V.; Lotya, M.; Blighe, F. M.; Sun, Z.; De, S.; McGovern, I. T.; Holland, B.; Byrne, M.; Gun'ko, Y. K.; Boland, J. J.; Niraj, P.; Duesberg, G.; Krishnamurthy, S.; Goodhue, R.; Hutchison, J.; Scardaci, V.; Ferrari, A. C. ja Coleman, J. N., High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite, *Nat. Nanotechnol.*, **2008**, *3*, 563–568.
54. Niyogi, S.; Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; McWilliams, J. L.; Hamon, M. A. ja Haddon, R. C., Solution Properties of Graphite and Graphene, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7720–7721.
55. Lee, H. C.; Liu, W.-W.; Chai, S.-P.; Mohamed, A. R.; Lai, C. W.; Khe, C.-S.; Voon, C. H.; Hashim, U. ja Hidayah, N. M. S., Synthesis of Single-layer Graphene: A Review of

- Recent Development, *Procedia Chem.*, **2016**, *19*, 916–921.
56. Li, X.; Cai, W.; An, J.; Kim, S.; Nah, J.; Yang, D.; Piner, R.; Velamakanni, A.; Jung, I.; Tutuc, E.; Banerjee, S. K.; Colombo, L. ja Ruoff, R. S., Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils, *Science (80-.)*, **2009**, *324*, 1312–1314.
57. Xu, M.; Fujita, D.; Sagisaka, K.; Watanabe, E. ja Hanagata, N., Production of Extended Single-Layer Graphene, *ACS Nano*, **2011**, *5*, 1522–1528.
58. Li, X.; Magnuson, C. W.; Venugopal, A.; Tromp, R. M.; Hannon, J. B.; Vogel, E. M.; Colombo, L. ja Ruoff, R. S., Large-Area Graphene Single Crystals Grown by Low-Pressure Chemical Vapor Deposition of Methane on Copper, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 2816–2819.
59. Cox, M. M. ja Nelson, D. L., The Three-Dimensional Structure of Proteins. Teoksessa: *Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition*, 6. painos, Macmillan Higher Education, Basingstoke, 2013, ss. 115–156.
60. Tuma, R., Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies, *J. Raman Spectrosc.*, **2005**, *36*, 307–319.
61. Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K. M.; Kaczor, A.; Pilarczyk, M. ja Baranska, M., Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.*, **2013**, *44*, 1061–1076.
62. Chittur, K. K., FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces, *Biomaterials*, **1998**, *19*, 357–369.
63. Berthomieu, C. ja Hienerwadel, R., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynth. Res.*, **2009**, *101*, 157–170.
64. Ihalainen, J. A.; Gustavsson, E.; Schroeder, L.; Donnini, S.; Lehtivuori, H.; Isaksson, L.; Thöing, C.; Modi, V.; Berntsson, O.; Stucki-Buchli, B.; Liukkonen, A.; Häkkänen, H.; Kalenius, E.; Westenhoff, S. ja Kottke, T., Chromophore-Protein Interplay during the Phytochrome Photocycle Revealed by Step-Scan FTIR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 12396–12404.
65. Takala, H.; Lehtivuori, H.; Hammarén, H.; Hytönen, V. P. ja Ihalainen, J. A., Connection between Absorption Properties and Conformational Changes in *Deinococcus radiodurans* Phytochrome, *Biochemistry*, **2014**, *53*, 7076–7085.

66. Cavagnero, S., Using NMR to Determine Protein Structure in Solution, *J. Chem. Educ.*, **2003**, *80*, 125.
67. Mrksich, M.; Dike, L. E.; Tien, J.; Ingber, D. E. ja Whitesides, G. M., Using microcontact Printing to Pattern the Attachment of Mammalian Cells to Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Transparent Films of Gold and Silver, *Exp. Cell Res.*, **1997**, *235*, 305–313.
68. Koskinen, P.; Karppinen, K.; Myllyperkiö, P.; Hiltunen, V.-M.; Johansson, A. ja Pettersson, M., Optically Forged Diffraction-Unlimited Ripples in Graphene, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2018**, *9*, 6179–6184.
69. Huang, L.; Liu, Y.; Ji, L.-C.; Xie, Y. Q.; Wang, T. ja Shi, W.-Z., Pulsed laser assisted reduction of graphene oxide, *Carbon N. Y.*, **2011**, *49*, 2431–2436.
70. Sokolov, D. A.; Shepperd, K. R. ja Orlando, T. M., Formation of Graphene Features from Direct Laser-Induced Reduction of Graphite Oxide, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 2633–2636.
71. Fabbro, A.; Scaini, D.; León, V.; Vázquez, E.; Cellot, G.; Privitera, G.; Lombardi, L.; Torrisi, F.; Tomarchio, F.; Bonaccorso, F.; Bosi, S.; Ferrari, A. C.; Ballerini, L. ja Prato, M., Graphene-Based Interfaces Do Not Alter Target Nerve Cells, *ACS Nano*, **2016**, *10*, 615–623.
72. Miao, F.; Bao, W.; Balandin, A. A.; Lau, C. N. ja Calizo, I., Temperature Dependence of the Raman Spectra of Graphene and Graphene Multilayers, *Nano Lett.*, **2007**, *7*, 2645–2649.
73. Katoch, J.; Kim, S. N.; Kuang, Z.; Farmer, B. L.; Naik, R. R.; Tatulian, S. A. ja Ishigami, M., Structure of a Peptide Adsorbed on Graphene and Graphite, *Nano Lett.*, **2012**, *12*, 2342–2346.
74. Das, A.; Pisana, S.; Chakraborty, B.; Piscanec, S.; Saha, S. K.; Waghmare, U. V.; Novoselov, K. S.; Krishnamurthy, H. R.; Geim, A. K.; Ferrari, A. C. ja Sood, A. K., Monitoring dopants by Raman scattering in an electrochemically top-gated graphene transistor, *Nat. Nanotechnol.*, **2008**, *3*, 210–215.
75. Miao, X.; Tongay, S.; Petterson, M. K.; Berke, K.; Rinzler, A. G.; Appleton, B. R. ja Hebard, A. F., High Efficiency Graphene Solar Cells by Chemical Doping, *Nano Lett.*, **2012**, *12*, 2745–2750.

76. Sedjo, R. ja Tian, X., Does Wood Bioenergy Increase Carbon Stocks in Forests?, *J. For.*, **2012**, *110*, 304–311.
77. McNally, H. A., Imaging and manipulating living neurons with atomic force microscopy, *26th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, IEEE, 2005, ss. 4473–4476.
78. Li, G.; Xi, N.; Yu, M.; Salem, F.; Wang, D. H. ja Li, J., Manipulating nano scale biological specimen in liquid, *Proc. IEEE Conf. Nanotechnol.*, IEEE, 2003, ss. 68–71.