



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Nanofluidic tools for bioanalysis : the large advantages of the nano-scale

Janssen, K.G.H.

Citation

Janssen, K. G. H. (2013, December 19). *Nanofluidic tools for bioanalysis : the large advantages of the nano-scale*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22946>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22946>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22946> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Janssen, Kjeld G.H.

Title: Nanofluidic tools for bioanalysis : the large advantages of the nanoscale

Issue Date: 2013-12-19

Dit proefschrift beschrijft nieuwe en geminiaturiseerde bioanalysetechnieken voor de levenswetenschappen. De drijvende kracht hierachter is het mogelijk maken van de analyse van sub-picoliter volumes in het algemeen, en voor metabolomics in het bijzonder. Centraal staat het verkennen van nanokanalen hiervoor, wat op zijn beurt de ontdekking van nieuwe fundamentele fysisch-chemische eigenschappen in de nanofluidica oplevert.

In **Hoofdstuk 1** wordt uiteengezet hoe systeembioologie, en metabolomics in het bijzonder, een grote bijdrage kunnen leveren aan het inzicht in ziekte en gezondheid. Daarmee kan het een belangrijke impuls aan de ontwikkeling van nieuwe behandelmethodes en medicijnen geven en de efficiëntie van bestaande vergroten. Om het potentieel van metabolomics te verwezenlijken, is het van belang ook de stofwisseling op meerdere niveaus en hun interacties in kaart te brengen, waaronder in weefsels en zelfs binnen één cel. Hiervoor zijn analyses nodig die om kunnen gaan met subcellulaire volumina, ofwel kleiner dan 1 picoliter (10^{-12} L), met een dus zeer beperkt aantal analietmoleculen.

Zulke kleine hoeveelheden zijn buiten het bereik van bestaande methodes. Het Lab-on-a-Chip concept, de miniaturisatie van scheidingstechnieken in microkanalen in een zogenaamde fluïdische chip, lijkt een geschikt uitgangspunt om dit aan te pakken. Verdere miniaturisatie is dan wel nodig naar kanalen die met de gewenste ordegroottes qua volume zouden kunnen omgaan, en wel kanalen met een diepte in de orde van tientallen nanometers: nanokanalen. De praktische inzetbaarheid van nanokanalen in fluïdische chips lijkt in eerste instantie echter erg ongunstig; sterke verdunningen zijn mogelijk nodig naar minimaal microliters voor sampletransport van de buitenwereld naar het minuscule kanaal. Ten opzichte van picoliters betekent dit een verdunningsfactor van een miljoen, waarmee het voordeel van nanokanalen komt te vervallen. Daarnaast zijn nanokanalen niet zomaar kleinere kanalen, op deze schaal is sprake van een ander

regime met eigen fysica en chemie; het onderwerp van het opkomende vakgebied nanofluidica.

In de introductie van dit proefschrift worden ook scheidingstechnieken geïnventariseerd. De door een elektrisch veld gedreven technieken in het bijzonder, want deze zijn intrinsiek compatibel met miniaturisatie. Een daarvan, isotachophorese (ITP) heeft als kenmerkende eigenschap dat het stoffen scheidt door ze op te concentreren in aangrenzende zones tot aan een bepaalde eindconcentratie. Voor ITP is een concentrerende factor van 1 miljoen in de literatuur gerapporteerd. Daarnaast geldt voor ITP een synergie met miniaturisatie. Dit komt doordat in kanalen met een kleinere doorsnee minder analiet-moleculen nodig zijn voor dezelfde eindconcentratie. Dit levert naar rato van miniaturisatie van de doorsnee langere zones op, wat een betere scheiding betekent. De combinatie van grote belaadbaarheid synergie met kleinere kanalen, maakt ITP een goede kandidaat voor miniaturisatie. Deze techniek is echter nog niet op nanoschaal toegepast.

Het doel van dit proefschrift is het onderzoeken van de uitdagingen en grenzen van de miniaturisatie van bioanalyses. Hiervoor zullen nanokanalen en hun eigenschappen bestudeerd worden als platform. Voor de compatibiliteit met grotere volumes zullen de grenzen van de miniaturisatie van isotachophorese verkend worden.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontdekking van de onverwachte dominantie van de zure eigenschappen van glas in nanokanalen. Deze eigenschap kwam naar voren bij het laten vullen van nanokanalen met vloeistof door middel van capillaire werking. De stof fluoresceïne, aanwezig in de oplossing, fluoresceert normaal zeer sterk. Het was toegevoegd om het vulproces te verduidelijken, maar was niet zichtbaar in het eerste deel van de vloeistof. Bij nader inzien bleek de fluorescente activiteit van deze stof sterk afhankelijk van de zuurtegraad (pH). Bekend is ook dat glas zwakzure silanol groepen (SiOH) aan zijn oppervlak heeft. De realisatie echter dat de hoeveelheid oppervlak ten opzichte van het volume in het kanaal, extreem genoeg kan zijn om de oplossing deels te titreren, ondanks een molair aan buffer, kan als tegenintuïtief ervaren worden. Het donkere en oplichtende deel van de vloeistof zijn te verklaren doordat de vloeistof die als eerste het kanaal instroomde werd getitreerd, waarna de vloeistof daaropvolgend een reeds van protonen uitgeputte wand tegenkwam en wel gewoon fluoresceerde. De verhouding tussen het wel en niet fluorescerende deel van de vloeistof in het kanaal bleek een maat voor de hoeveelheid protonen die per oppervlakte door de wand waren afgegeven, en de verhouding (tussen de twee delen) hing af van de hoeveelheid zouten en de pH van de oplossing.

Deze experimentele gegevens geven inzage in het gedrag van de overgangslaag tussen glas en de vloeistof; de elektrochemische dubbellaag. Hiermee kon een kwantitatief model dat het gedrag van deze elektrochemische dubbellaag beschrijft opgesteld worden. Siliciumoxides, zoals glas en kwarts, zijn een belangrijk materiaal in Lab-on-a-Chip toepassingen, en deze bevindingen zijn dan ook relevant voor de verdere miniaturisatie van microfluidische chips, alsook voor microkanalen, capillairen, membranen, en zelfs in zand en gesteentes.

Hoofdstuk 3 beschrijft hoe met nanokanalen de grenzen van de miniaturisatie opgezocht worden door ITP toe te passen op 0.4 en 0.2 pL volumes, de kleinste volumes ooit gerapporteerd met deze techniek. Uitgevoerd in respectievelijk 20 μm bij 50 nm en 3 μm bij 330 nm kanalen. Deze volumes zijn van belang omdat deze in de orde zijn van ongeveer 5% respectievelijk 2.5% van het volume van een 25 μm doorsnee cel, of ongeveer het volume van 1 bacterie. Het sample bestond uit een oplossing van cel-extract met 2 fluorescent gelabelde aminozuren (respectievelijk 40 en 20 attomol analiet in 0.4 en 0.2 pL). In de 330 nm diepe kanalen werden de stoffen ook duidelijk geconcentreerd en gescheiden. In de 50 nm diepe kanalen lukte het opconcentreren met ITP wel maar het scheiden niet omdat de elektrische veldsterkte niet even hoog gemaakt kon worden.

Deze onverwachte grens voor de miniaturisatie van ITP werd opgelegd door een nieuw fenomeen: electrocavitatie. Afhankelijk van de elektrische veldsterkte kon de waterkolom in het kanaal gecontroleerd gebroken worden; hoe ondieper het kanaal, des te lager de benodigde veldsterkte. Een te ondiep nanokanaal legt dus een praktische grens op aan de maximale veldsterkte bij ITP, en daarmee de scheidingsefficiëntie. Op basis van een voorlopige berekening kan worden geschat dat dit veroorzaakt wordt door een onderdruk in de orde van 2000 atmosfeer. Het verkennen van de mogelijkheid om daarmee nanokanalen te gebruiken voor gecontroleerde cavitatie-experimenten is momenteel gaande. Overigens kon dit effect ook omgekeerd worden, zodat ook positieve drukken gegenereerd werden van dezelfde orde, iets wat mogelijk erg interessant kan zijn voor ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC) toepassingen.

In **Hoofdstuk 4** wordt de nieuwe scheidingstechniek depletiezone isotachophorese (dz-ITP) gepresenteerd. Deze techniek is een voorbeeld van de synergie van een nanofluidisch fenomeen met microfluidica (voor een uitleg over dz-ITP in detail zie sectie 1.4.4). Een nanokanaal wordt gebruikt om door middel van concentratie-polarisatie een deel van de vloeistof van de lokaal (bij de ingang naar het nanokanaal) te ontzouten. Haaks daarop loopt daar een microkanaal langs, waardoor in het microkanaal heel lokaal achtergrondbuffer wordt weggepompt en een gradiënt in zoutsterkte ontstaat, en dus in de lokale elektrische veldsterkte. Op het grensvlak tussen het ontzoutte gedeelte en de buffer vindt dan zogenaamde gradiëntopconcentrerings plaats. Het ontzoutte deel vervult de rol die lijkt op die van het zogeheten trailing elektrolyt in ITP, de achtergrondbuffer fungeert dan als de leading buffer. Dit betekent dat de isotachophorese wordt uitgevoerd met slechts één elektrolyt. Dit is een groot voordeel van deze techniek, wat in de praktijk een belangrijke simplificatie en toename van de keuzevrijheid betekent. Nu beperkt een gebrek aan keuzes nog de inzet en de toegankelijkheid van isotachophorese. Deze belangrijke verbeteringen maken deze nieuwe techniek van grote waarde voor de bio-analyse, waar analyse van vaak complexe samples nodig is. Het heeft namelijk niet alleen de mogelijkheden van gewone ITP zoals techniek voor monstervoorbewerking, opzuivering en/of concentratie en scheidingstechniek. Daarnaast is, in tegenstelling tot standaard ITP, in dz-ITP de positionering statisch en is door middel van het variëren van de veldsterktes

een grote controle over het systeem mogelijk. Een demonstratie van deze eigenschappen worden gegeven in het hoofdstuk.

Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is een techniek waarmee op nanometers vanaf een zilveren oppervlak met grote gevoeligheid (bio)moleculen gemeten kunnen worden, van sommige stoffen is één molecuul detecteerbaar. Hierbij worden vibratiespectra gemeten, die zijn informatief wat betreft het molecuul en ondersteunen identificatie. Dit zijn ideale eigenschappen voor een detectieprincipe in een nanokanaal. Op dit moment is SERS op die manier niet inzetbaar: het oppervlak vervuult en SERS wordt daarom nu ingezet voor eenmalig gebruik. Om SERS hiervoor toch inzetbaar te maken worden in **Hoofdstuk 5** de eerste resultaten van een dynamische SERS-sensor (SERSOR) beschreven. Een coating van polyethyleenglycol beschermt het oppervlak tegen irreversibele binding en vervuiling, maar is tegelijkertijd dun genoeg om analiet-moleculen dicht genoeg bij het zilver te laten voor SERS. Voordat de SERSOR zijn potentieel waar kan maken moet echter de stabiliteit van de coating-procedure worden verbeterd. Op het vlak van de coatingchemie is er daarvoor al veel kennis voorhanden. Ten tweede zal de SERSOR geïmplementeerd moeten worden in een micro- of nanokanaal. Gelukkig is er al een essentiële stap reeds gedemonstreerd in de vorm van een zilverspiegel gefabriceerd in de wanden van het nanokanaal²⁵¹ (voor een Fabry-Perot interferometer)

In **Hoofdstuk 6** wordt de inhoud van de voorgaande hoofdstukken beschouwd en worden enkele conclusies gegeven en aanbevelingen gedaan over de mogelijke vervolgonderzoeken.

Tot slot mag geconcludeerd worden dat met dit onderzoek op het vlak van fysica, chemie en platformontwikkeling een stap is gezet in het verleggen van de grenzen van bioanalyses naar de nanoschaal. Het hiervoor verkennen van nanofluidische chips heeft de analyse van het kleinste volume ooit met isotachophorese opgeleverd. De haalbaarheid van isotachophorese op deze schaal is belangrijk voor de analyse van kleine volumes in het algemeen en complexe biologische monsters zoals in metabolomics in het bijzonder. Onderweg werden ook nieuwe fysische inzichten verkregen door fenomenen die optraden in nanokanalen. Behalve nanokanalen en kennis van hun bijzondere fenomenen, zijn voor de praktische haalbaarheid van een sub-pL bioanalysemethode twee andere aspecten essentieel. Ten eerste een techniek als isotachophorese, om de noodzakelijke brug te slaan tussen de kleine volumes in een nanokanaal en de buitenwereld via welke het sample vanaf de monsterafname, doorgaans in grote volumes getransporteerd wordt. Ten tweede, de integratie van een meettechniek zoals een SERSOR die gevoelig biomoleculen in een nanokanaal zou moeten kunnen meten. Het doorontwikkelen van deze nanofluidische gereedschapsset zal een meettechniek mogelijk maken die het metabolisme en de ontwikkeling van een enkele cel kan volgen, zoals van een stamcel, neuron, of eicel.