



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Single-electrolyte isotachophoresis : on-chip analyte focusing and separation

Quist, J.W.

### Citation

Quist, J. W. (2014, March 20). *Single-electrolyte isotachophoresis : on-chip analyte focusing and separation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/24857>

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/1887/24857>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/24857> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Quist, Johannes Willem

**Title:** Single-electrolyte isotachopheresis : on-chip analyte focusing and separation

**Issue Date:** 2014-03-20

## Nederlandstalige samenvatting

Dit proefschrift gaat over de ontwikkeling van nieuwe methoden om (bio)chemische stoffen te scheiden en op te concentreren op basis van elektrische eigenschappen. Het uiteindelijke doel van deze methoden is om belangrijke stoffen met hoge gevoeligheid te kunnen detecteren in kleine hoeveelheden van complexe biologische monsters. Hierbij kan gedacht worden aan bijvoorbeeld ziektemarkers in bloed.

Hoofdstuk 1 geeft een korte inleiding en een motivatie waarom de technieken die in dit proefschrift beschreven staan van belang zijn voor het oplossen van belangrijke problemen op bioanalytisch gebied. Daartoe is onderzoek gedaan naar zowel theoretische concepten (hoofdstuk 2) als nieuwe technieken voor praktisch gebruik (hoofdstuk 3-5).

Stoffen die opgelost zijn in water hebben vaak een elektrische lading omdat zij ioniseren. Wanneer een elektrische spanning aangelegd wordt over een vloeistofkanaaltje dan zijn er allerlei trucs mogelijk waarmee deze ionen bijvoorbeeld gescheiden of geconcentreerd kunnen worden. In hoofdstuk 2 worden twee soorten van zulke methoden beschreven: isotachoforese (afgekort ITP) en "electric field gradient focusing" (afgekort EFGF). Opvallend is dat zowel ITP als EFGF in staat zijn om tegelijkertijd stoffen te scheiden en op te concentreren. Vooral dat laatste kunnen beide methoden heel efficiënt: concentratiefactoren van meer dan 10000 of zelfs een miljoen zijn herhaaldelijk in de wetenschappelijke literatuur gerapporteerd! Maar zo ingewikkeld als deze methoden klinken, zo moeilijk zijn ze ook te begrijpen. Daarom worden ze in hoofdstuk 2 uitgebreid uitgelegd. ITP is een methode

die twee verschillende zones van elektrolyten (ionenoplossingen) benut. Andere ionen worden tijdens een ITP-scheiding ingeklemd tussen deze zones en daar opgeconcentreerd. Als er genoeg aanwezig is, dan vormt zo'n stof een eigen zone. Is een ITP-scheiding eenmaal voltooid, dan ontstaat een trein van verschillende stoffen die achter elkaar met dezelfde snelheid zullen bewegen. De andere klasse van methoden, EFGF, bevat veel verschillende methoden. Wat ze met elkaar gemeen hebben is dat ze geladen stoffen onder invloed van een elektrisch veld tegen een vloeistofstroom in laten bewegen. Op het moment dat de stoffen een gradiënt in het elektrisch veld tegenkomen, zullen ze langzamer of juist sneller bewegen, totdat een punt bereikt wordt waarop de stoffen net zo hard gaan als de tegengestelde vloeistofstroom en staan ze op het oog stil. Op dat punt, dat voor iedere stof op een andere plaats kan liggen, worden deze stoffen gefocust en dus opgeconcentreerd. Er is nu een interessante theoretische ontdekking mogelijk: als een EFGF-scheiding voltooid is, dan staan al die geladen stoffen stil in de vloeistofstroom. Met andere woorden, ze bewegen allemaal met dezelfde snelheid, net als in ITP. Het moet dus mogelijk zijn om ook alle belangrijke kenmerken van ITP terug te vinden in EFGF-methoden. Wanneer de wetenschappelijke literatuur nagegaan wordt om te kijken wat er is waargenomen bij EFGF-methoden, dan worden inderdaad alle belangrijke ITP-verschijnselen teruggevonden. Het belangwekkende van deze ontdekking is dat heel veel trucs die ontwikkeld zijn voor ITP toegepast kunnen worden op EFGF, en andersom. Daardoor is het mogelijk om nieuwe bioanalytische methoden te ontwikkelen die ontzettend veelzijdig zijn.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontdekking van een nieuwe methode die de kenmerken van EFGF en ITP in zich verenigt. Depletiezone-isotachoforese (dzITP), zoals we deze nieuw door ons ontdekte methode genoemd hebben, wordt uitgevoerd in glazen chips met daarin een aantal vloeistofkanaaltje die gevuld zijn met een elektrolyt. Er zijn twee parallel lopende microkanalen die verbonden zijn door een nanokanaal. Glasoppervlakken zijn geladen als ze in contact staan met een waterige oplossing. In een glas met water merk je daar niets van, maar in een nanokanaal zitten de glasoppervlakken zo dicht bij elkaar dat ze zorgen voor bijzondere eigenschappen: een nanokanaal in glas laat positief geladen ionen veel makkelijker door dan negatief geladen ionen. Wordt een elektrische stroom door het nanokanaal gestuurd, dan heeft dat tot gevolg dat aan de ene ingang van het nanokanaal ionen zich ophopen, terwijl ze aan de andere kant aan de vloeistof onttrokken worden. Zo een gebied waaraan ionen onttrokken zijn wordt een depletiezone genoemd. Aan de rand van de depletiezone is een sterke gradiënt in het elektrisch veld. Daar kan dus EFGF plaatsvinden: geladen stoffen kunnen sterk worden geconcentreerd aan de rand van de depletiezone. Als verschillende stoffen in hoge concentraties toevoegt worden, gebeurt er iets wat (zonder de kennis van hoofdstuk 2) onverwacht is: elk van de stoffen vormt een plateauvormige zone precies zoals in ITP. In tegenstelling tot gewone ITP zijn bij dzITP niet twee elektrolyten nodig, maar slechts één. Het andere elektrolyt wordt vervangen door de depletiezone. Dit kan ITP aanzienlijk eenvoudiger maken voor gebruik in diverse bioanalytische experimenten. Er zijn ook andere voordelen: in dzITP focussen stoffen zich op een stabiele positie, en bovendien kan die positie gevarieerd worden door simpelweg de gebruikte voltages te veranderen.

Hoofdstuk 4 laat zien dat de depletiezone in dzITP gebruikt kan worden als een soort filter. Dit kan gedaan worden door de toegepaste voltages of stroomsterkte te variëren, net als bij het positioneren van de dzITP-zones. Het filter kan helemaal afgesloten worden, dan hopen alle moleculen zich op achter het filter. Het kan ook gedeeltelijk afgesloten worden, dan kan een deel van de stoffen er langs, maar er ontstaat nog wel een ophoping van stoffen. Dit effect kan in dzITP gecombineerd worden met het feit dat verschillende stoffen zich scheiden in verschillende zones als ze opgehoopt worden. Dat leidt tot interessante mogelijkheden. Door afwisselend het scheidingskanaal geheel dan wel gedeeltelijk af te sluiten met een depletiezone kunnen de gescheiden zones om de beurt langs de depletiezone gestuurd worden. Wanneer stoffen continu aangevoerd worden, is het ook mogelijk om de filterafsluiting zodanig in te stellen dat de stoffen die zich vooraan zouden ophopen continu langs de depletiezone stromen, maar omdat niet alles erlangs kan hopen de "achterste" stoffen zich nog wel op. De filterwerking is dan als volgt: stoffen die langzaam tegen de stroom in migreren worden met de vloeistofstroom langs de gedeeltelijke afsluiting gesleurd, terwijl stoffen die snel tegen de stroom in migreren zich ophopen. Dit kan bijvoorbeeld gebruikt worden om een snel migrerende stof die een veel lagere concentratie heeft dan een andere, langzaam migrerende stof zolang op te hopen tot die juist een hogere concentratie had. Ook kan men een markerstof gebruiken die gedeeltelijk langs de depletiezone migreert. Stoffen die langzamer migreren dan de marker stromen langs de depletiezone, terwijl sneller migrerende stoffen selectief opgehoopt worden en gescheiden worden in aparte zones. Dit experiment werd uitgevoerd met een verdund urinemonster, waaruit een aantal stoffen selectief opgeconcentreerd konden worden.

In hoofdstuk 5 worden experimenten beschreven in chips die gemaakt zijn van PDMS. Dit is een rubberachtig, doorzichtig en flexibel materiaal. In deze chips kunnen kleppen gemaakt worden door twee kanalen elkaar te laten kruisen, gescheiden door een dun membraan. Door druk te zetten op één van de kanalen wordt het membraan in het andere kanaal gedrukt, zodat dit kanaal afgesloten wordt. Het is echter mogelijk, onder de juiste omstandigheden, dat het kanaal niet helemaal afgesloten wordt en er nog een vloeistoffilm aanwezig blijft onder het membraan. In dit geval wordt een nanokanaal gecreërd, en als er dan een elektrische stroom doorheen geforceerd wordt zou men daar de effecten van moeten zien, zoals de vorming van een depletiezone. Deze hypothese kon met diverse experimenten inderdaad bevestigd worden. De mate waarin een depletiezone zich vormt kan gevarieerd worden door de druk op de klep te veranderen. Stoffen kunnen geconcentreerd worden aan de rand van de depletiezone volgens de principes van EFGF. Een hoge druk op de klep gecombineerd met hoge voltages geeft de hoogste concentratiefactoren. Na het concentreren van een stof kan de klep weer geopend worden, zodat de stof verder gestuurd kan worden door de kanaalstructuur voor nadere analyse. Overigens worden PDMS chips met dergelijke kleppen gebruikt voor zogenaamde "labs op een chip" om bijvoorbeeld de DNA-volgorde in een enkele cel te bepalen. Het is interessant dat dezelfde kleppen nu dus ook gebruikt kunnen worden voor EFGF-functionaliteit.

Tenslotte worden er in hoofdstuk 6 nog enkele conclusies getrokken en worden er enkele lijnen uitgezet voor toekomstig onderzoek. dzITP is een veelbelovende, veelzijdige methode. Het zou interessant zijn om honderden

dzITP-scheidingen op een enkele chip te integreren voor massief-parallelle analyses. Met dzITP kan ook de gevoeligheid en betrouwbaarheid van metingen met massaspectrometrie (een techniek om veel verschillende chemische stoffen te detecteren en te identificeren) zeer waarschijnlijk sterk verbeterd worden. Ook zou het heel goed toegepast kunnen worden in bioassays, voor snelle metingen van specifieke (biologische) stoffen. Met name in het laatste geval biedt dat perspectieven voor nieuwe mogelijkheden om ziektemarkers te meten in ziekenhuizen en huisartsenpraktijken.