

Optimalisatie en miniaturisatie van een NCD-gebaseerde immunosensor

Jan Bex

promotor :
Prof. dr. Patrick WAGNER

co-promotor :
Prof. dr. Ken HAENEN

Woord vooraf

Toen ik tijdens mijn junior stage het onderwerp voor mijn thesis hoorde, sprong ik bijna een gat in de lucht. Werken aan een impedimetrische immunosensor op basis van gegroeid diamant? Dat soort onderwerpen waren de reden dat ik ervoor gekozen heb om nog twee jaar bio-elektronica en nanotechnologie te volgen. Ik moest en zou dat onderwerp ook voor mijn masterthesis krijgen. En hier zijn we dan, een goed jaar later.

Ik heb enorm veel bijgeleerd over dit boeiende materiaal, maar wat mij vooral opviel was het verschil in stijl. Tijdens mijn thesis voor mijn opleiding industrieel ingenieur werkte ik in een routinelabo: precies, nauwkeurig, gereguleerd... Ik moest in het begin erg wennen aan de vrijheid die ik in een research laboratorium zoals het IMO kreeg. Niet dat ik dit slecht vind, na een tijd begon ik immers te merken dat creativiteit veel meer kansen krijgt in zo een omgeving, wat zeker in de research een voordeel is.

Ik heb in deze stage enorm veel steun gehad aan mijn begeleider Lars Grieten. Hij heeft mij met raad en daad bijgestaan om dit project tot een goed einde te brengen en om te helpen oplossingen te vinden voor de tegenslagen die je onvermijdelijk op zo een stage tegenkomt. Ik wil ook graag mijn promotor, prof. Dr. Patrick Wagner bedanken om mij een kans te geven om deze stage uit te voeren. Prof. dr. Wagner wist dat dit onderwerp mij enorm interesseerde en het doet mij dan ook groot plezier dat ik het heb mogen doen. Ook Jef, Martijn en Pieter hebben op het IMO elke dag met mij meegewerkt, we hebben elkaar advies en hulp gegeven en de kameraadschap die hieruit gegroeid is, is niet meer kapot te krijgen. Verder wil ik al de doctoraatsstudenten van de BIOS-groep bedanken, voor mij de weg te wijzen in het labo als Lars er niet was, en voor het advies dat ze mij gegeven hebben.

Inhoud

Woord vooraf	2
Abstract	5
1 Inleiding	6
1.1 Wat is een biosensor?	6
1.2 Het analyt: C-Reactief proteïne	7
1.3 De transducer: nanocrystalline diamond (NCD).....	8
1.4 De immobilisatielaag: amine-functionaliserings.....	9
1.5 De uitlezing: elektrochemische impedantie spectroscopie(EIS)	11
1.6 Optimaliseren van de opstelling.....	11
2 Materiaal en methoden	13
2.1 Groei van een NCD-substraat.....	13
2.2 Optimalisatie van antilichaam adsorptie aan NCD films	14
2.2.1 Principe.....	14
2.2.2 Materiaal	15
2.2.3 Werkwijze	15
2.3 NH ₂ -functionalisatie van NCD.....	16
2.3.1 Principe.....	16
2.3.2 Materialen	17
2.3.3 Werkwijze	17
2.4 Contacthoekmetingen	18
2.4.1 Principe.....	18
2.4.2 Toepassing.....	19
2.4.3 Materiaal	19
2.4.4 Werkwijze	19
2.5 Impedantiemetingen.....	20
2.5.1 Principe.....	20
2.5.2 Materialen	21
2.5.3 Werkwijze	21
2.5.4 Toepassing.....	22
3 Resultaten	24
3.1 Fluorescentiemetingen van antilichaamadsorptie.....	24
3.1.1 Vergelijking tussen gehydrogeneerd en geoxideerd NCD.....	24
3.1.2 Fluorescentietesten van de antilichamen	26
3.2 Functionaliserings van NCD.....	30
3.2.1 Functionaliserings met allylamine	30

3.2.2	Functionalisatie met ethyleendiamine.....	35
3.3	Design maskers.....	38
3.4	Impedantiemetingen.....	38
3.4.1	<i>Top-down</i> opstelling.....	38
3.4.2	Coplaire opstelling.....	40
4	Discussie en conclusies.....	47
4.1	Fluorescentiemetingen van adsorptie.....	47
4.2	NH ₂ -functionalisatie	47
4.3	Impedantiemetingen.....	48
	Bibliografie	50
	Bijlage: Interpretatie van impedantieresultaten.....	52

Abstract

C-reactief proteïne (CRP) is een basismarker voor ontstekingen. Recent onderzoek toont tevens aan dat een hoge CRP-concentratie in het bloed een risico-indicator is voor hart- en vaatziekten. Ook bij andere ziekten die ontstekingen veroorzaken zijn er indicaties dat een hoge CRP-concentratie een invloed heeft. Aangezien hart- en vaatziekten de meest voorkomende doodsoorzaken zijn in de Westerse wereld is het belangrijk deze indicator goed op te volgen bij risicopatiënten. De huidige standaarden voor CRP-detectie zijn enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) en turbidimetrische assays. Deze methoden vereisen meerdere reactiestappen en labels en zijn dus duur en tijdrovend. In deze studie wordt getracht een bestaand immunosensorplatform te optimaliseren en miniaturiseren om in *real-time* en labelvrij CRP-concentraties te bepalen.

Nanokristallijn diamant (NCD) wordt als substraat gekozen, vanwege de biocompatibiliteit, de chemische inertie en omdat door dopering interessante elektronische eigenschappen mogelijk zijn. Dat een NCD-gebaseerde immunosensor CRP kan detecteren, werd reeds bewezen in een eerdere studie, waarbij elektrochemische impedantie spectroscopie als uitlezing werd gebruikt. In deze studie wordt het concept verder uitgewerkt.

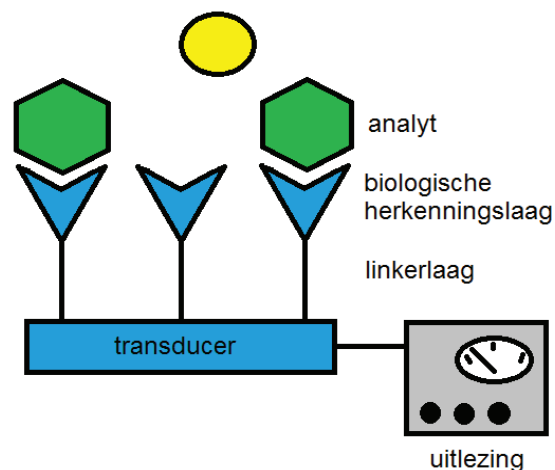
Een eerste belangrijke stap is de miniaturisatie van de opstelling. De kleinere opstelling die in deze studie gebruikt wordt heeft een kleinere signaal/ruis-verhouding, door nauwkeuriger verbindingen, minder bekabeling en meerdere meetelektroden per meetcel. Bovendien kan deze opstelling gebruikt worden voor verder gebruik in array en differentiatie metingen. Deze opstelling wordt gekarakteriseerd met impedantiemetingen.

De tweede stap is een poging om een covalente binding te vormen tussen de detectiemolecule en het diamant om de stabiliteit en de reproduceerbaarheid van de sensor te verhogen. Hiervoor wordt een aminogetermineerd diamantoppervlak gevormd. CRP-antilichamen bezitten immers vrije COOH-groepen op het Fc-uiteinde en deze kunnen een peptidebinding vormen met de NH₂-groepen op het NCD. Uit eerder onderzoek blijkt dat een rechtstreekse binding van aminogroepen aan het oppervlak onstabiel is, dus kan er beter een binding gemaakt worden met een linker die een primaire aminogroep bevat. Allylamine en ethyleendiamine zijn hiervoor mogelijke linkermoleculen. In dit onderzoek wordt de binding van deze linkers aan het oppervlak verder bestudeerd met contacthoekmetingen, XPS en confocale fluorescentiespectroscopie.

1 Inleiding

1.1 Wat is een biosensor?

Biosensoren bestaan uit 3 grote componenten (Figuur 1): ten eerste is er een biologische laag op het substraat voorzien. Deze laag produceert een biologisch signaal na interactie met het analyt. Een tweede laag is de transducerlaag, die het biologisch signaal omzet in een uitleesbaar signaal. De biologische laag wordt vaak aan de transducerlaag gebonden om sensitiviteit van de uitlezing te verhogen. Linkermoleculen hechten deze biologische moleculen aan het substraat. De laatste component is de uitlezing: een apparaat dat de signalen die door de transducerlaag omgezet worden verwerkt en opslaat.



Figuur 1: een schematische voorstelling van een biosensor

Als de biologische herkenningslaag een antilichaam is wordt gesproken van immunosensoren. Immunosensoren versnellen, vereenvoudigen en reduceren de kosten van medisch onderzoek. Huidige immunoassays zijn echter duur en tijdrovend door de vele reactiestappen, de dure reagentia, het opgeleid personeel en de infrastructuur die ervoor vereist zijn.

Voor dit onderzoek is het analyt C-reactief proteïne (CRP) en dit wordt gedetecteerd met een sensor op basis van nanokristallijn diamant (NCD), vanwege de duurzaamheid en verdere nuttige eigenschappen van dit materiaal. Het uitlezingsysteem maakt gebruik van elektrochemische impedantie spectroscopie (EIS), waarmee veranderingen aan het transduceroppervlak gemakkelijk weer te geven zijn. Bovendien is EIS een labelvrije meetmethode, wat de kosten van metingen reduceert. Toepasbaarheid in *point-of-care* en in situ metingen is ook een vereiste.

Er bestaan reeds enkele immunosensoren voor CRP. Een surface plasmon resonance (SPR)-gebaseerde sensor werd reeds beschreven door Meyer et al.(1). Deze haalt een sensitiviteit van 2-5

mg/l in bufferoplossing, maar heeft geen quantificeerbare concentraties boven 5 mg/l en vereist vele reactiestappen om het antilichaam te hechten aan het meetoppervlak. Aizawa et al. (2) construeerden reeds een immunoassay op basis van batchmetingen met een quartz crystal microbalance (QCM), met een sensitiviteit in menselijk serum van 0,2-0,6 mg/l. Indien er CRP aanwezig is, bindt dit aan latex bolletjes gecoat met anti-CRP. Deze agglutineren waardoor de frequentie verandert. Deze sensor vereist echter een stabilisatietijd van 60 min. per meting en kan enkel in batch meten. Door stabiliteitsproblemen zijn *real-time* metingen onmogelijk. Bovendien moeten de latexbolletjes op voorhand voorbereid zijn. Ook McBride et al. (3) ontwikkelden een QCM-gebaseerde sensor, deze keer zonder latexbeads met een sensitiviteit in menselijk serum van 5 mg/l. Deze zou wel *real-time* metingen kunnen uitvoeren, maar ijking voorafgaand aan metingen is nog steeds problematisch.

Op het Instituut voor materiaalonderzoek in de BIOS-groep werden reeds NCD-gebaseerde CRP-sensoren bestudeerd (4). Bijmens et al. hebben een fysisorptie gebaseerde NCD-biosensor getest. In hun onderzoek wordt een bewijs geleverd voor specifieke discriminatie via EIS tussen CRP en plasminogeen of FITC-DNA als referentiemoleculen in *real-time* bij lage frequenties (100 Hz) op NCD.

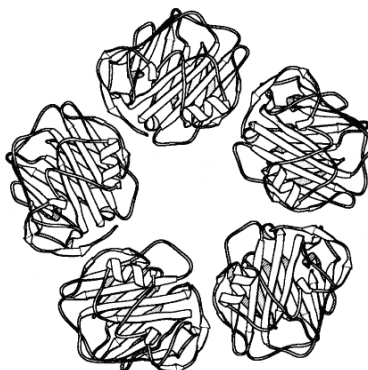
Het doel van deze studie is een bestaand immunosensorplatform optimaliseren. Eveneens wordt onderzocht of de opstelling geminiaturiseerd kan worden. Het belangrijkste doel van de optimalisatie is een stabiele binding te bekomen tussen de biologische laag en het transduceroppervlak, dus tussen de anti-CRP en het nanokristallijn diamant. Dit zou uitgevoerd kunnen worden door een aminogetermineerde linkermolecule tussen anti-CRP en NCD te plaatsen.

1.2 Het analyt: C-Reactief proteïne

C-reactief proteïne (CRP) is een acute fase proteïne, dat sterk toeneemt in concentratie bij ontstekingen en wonden (van ± 1 mg/l normaal naar >5 mg/l bij ontstekingen (1)). Door deze eigenschap is het een goede merker voor inflammatoire aandoeningen van een patiënt. CRP bestaat uit vijf identieke subunits die een pentamere structuur vormen met een totaal moleculair gewicht van 115 kDa (Figuur 2). CRP bindt aan lichaamsvreemde en beschadigde cellen, die vervolgens gefagocyteerd worden door macrofagen die een CRP-receptor bezitten. Recent onderzoek toont tevens aan dat CRP-niveaus ook een aanduiding geven voor hartziekten (5,6). CRP blijkt hiervoor een uitstekende indicator te zijn. Gezien de vergrijzing en het toenemende aantal hartpatiënten dat hieruit volgt, is een snelle risicoanalyse van de patiënten, met behulp van een CRP-biosensor bijvoorbeeld, noodzakelijk.

CRP-niveaus worden momenteel bepaald met hoge sensitiviteits-ELISA's die een sensitiviteit van ongeveer 0,2 mg/l halen (7).

Met de huidige stand van technologie is een snelle, *real-time* detectie van CRP-niveaus met een elektronische uitlezing mogelijk. In dit onderzoek wordt getracht om een binding met een geschikt substraat te ontwikkelen en te optimaliseren, zodat de sensor snel werkt en er een representatief beeld wordt gevormd van de oplossing boven het substraat voor diagnose en analyse.



Figuur 2: de structuur van CRP (8)

In dit onderzoek wordt verder gewerkt aan een sensor ontworpen door Bijnens et al. (4). Zij construeerden een CRP-sensor waarbij EIS snel de binding in *real-time* kan opvolgen zonder labelen. Aan het substraattoepervlak wordt anti-CRP gehecht, waar het CRP uit stalen aan kan binden. In een vorige studie werd reeds geprobeerd een covalente aanhechting te vormen, maar door gebrek aan een negatieve controle waren wasstappen noodzakelijk om geadsorbeerd anti-CRP te verwijderen en dit zorgde voor problemen. Bij deze thesis waren negatieve controles wel aanwezig en is dus verder gewerkt aan dit onderzoek. Verder wordt de mate van adsorptie van het anti-CRP aan het NCD-opervlak onderzocht.

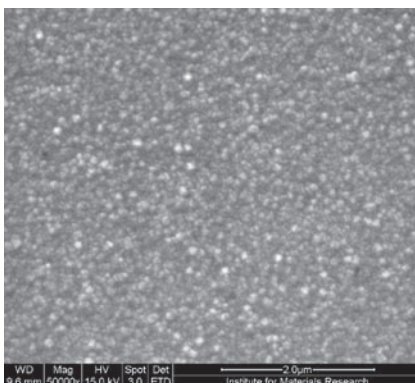
1.3 De transducer: nanocrystalline diamond (NCD)

Er zijn vele eisen voor een transducer van een biosensor. Allereerst moet het materiaal biocompatibel zijn, zodat het analyt niet degradeert. Het moet in lagen gefabriceerd kunnen worden, zodat het geïntegreerd kan worden in een elektronisch systeem. Deze integratie vereist ook elektronische eigenschappen van het transducermateriaal.

Het materiaal dat aan al deze eisen voldoet is nanocrystalline diamond (NCD) (Figuur 3). NCD heeft daarenboven nog meer voordelen: zo is het chemisch inert, hard en heeft een hoge dichtheid. Het heeft ook een lage wrijvingscoëfficiënt, optische transparantie in UV-VIS en infrarood, een lage elektron emissie drempelspanning en een hoge warmtegeleiding. NCD heeft transparante eigenschappen afhankelijk van de doping, heeft een breed elektrochemische bereik en kan door chemische doping omgevormd worden tot een halfgeleider. Chemische modificaties zijn mogelijk, maar vereisen veel energie om de sp^3 bindingen van het diamant te kunnen verbreken.

NCD ontstaat door het substraatoppervlak te bedekken met diamant *seeds* waarbij elke diamant *seed* als kiem dienst doet. Hierdoor vormen nucleatiesites op de plaatsen waar de diamantkiemen afgezet zijn. Door deze kiemen verder te laten groeien met Chemical vapor deposition (CVD), vormt zich een diamantfilm van diamantkristallen op nm-schaal.

Microwave enhanced plasma chemical vapor deposition (MWEP-CVD) van diamant is een techniek waarbij pyrolyse van koolwaterstoffen in plasma ervoor zorgt dat er een columnaire groei van diamant kristallen plaatsvindt op de aangebrachte nucleatidsites. Methaan en waterstofgas worden in een reactor gebracht op lage druk. Energie voor plasmavorming wordt door microgolven geleverd. Door het plasma vormen de koolwaterstoffen om tot koolstofradicalen, die binden aan de diamant 'seeds' en deze verder doen groeien, tot een laag van NCD bekomen wordt. Tri-methyl boraan gas ($(\text{CH}_3)_3\text{B}$) wordt toegevoegd om het NCD te doperen tot p-type.

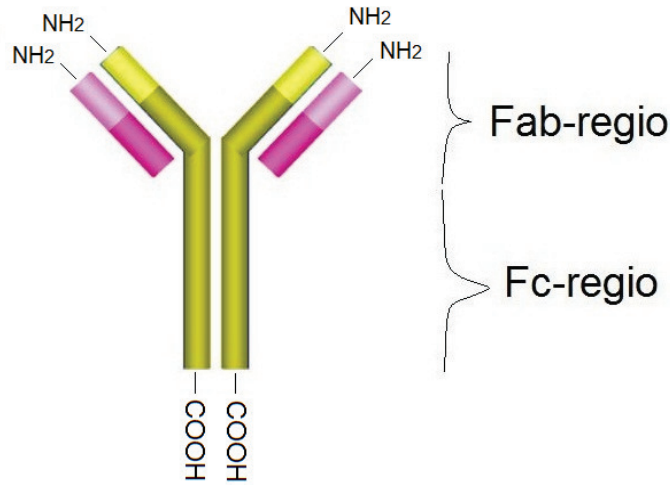


Figuur 3: een SEM-opname van een nanokristallijne diamantfilm

Voor de covalente binding van het anti-CRP en het NCD is het natuurlijk van belang welke oppervlaktebehandeling het NCD ondergaan heeft. NCD kan verschillende eindgroepen bezitten, afhankelijk van de techniek. Via plasma behandeling, chemisch of elektrochemisch etsen kunnen NCD-stalen geoxideerd of gehydrogeneerd worden. Nebel et al. vermelden dat geoxideerde oppervlakken betere adsorptie eigenschappen maar slechtere elektronische eigenschappen bezitten en bij gehydrogeneerd NCD zou dit omgekeerd zijn (9). In het artikel staat echter dat dit vermoedens zijn, wat Nebel zelf ook nog eens bevestigde op de Diamond workshop 2010 in Hasselt. Deze vermoedens moeten nog geverifieerd worden.

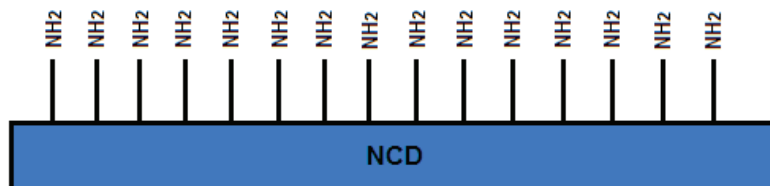
1.4 De immobilisatielaag: amine-functionaliserie

Omdat de IgG antilichamen tegen CRP een sterisch vrije carboxyleindgroep bezitten aan de Fc-regio (Figuur 4), is het belangrijk voor dit onderzoek om NH_2 -getermineerd NCD te creëren. Het antilichaam kan dan binden via carbodiimide chemie aan de NH_2 -groep.



Figuur 4: de structuur van anti-CRP

Een geamineerd NCD-oppervlak (Figuur 5) kan op verschillende manieren verwezenlijkt worden. Directe aminering van H-getermineerd diamant met behulp van NH₃-plasma is al beschreven door Szunerits et al. (10). Een tweede methode is aminering van een gechloreerd diamantoppervlak. May et al. (11) gebruikten UV-belichting of thermische halogenering om met chloor- en ammoniakgassen een geamineerd oppervlak te bekomen. Strother et al. (12) en Yang et al. (13) hebben in de laatste jaren stabielere bindingen proberen te realiseren met linkermoleculen. Belangrijk is ook dat het gaat om een primair amine, zodat het amine sterisch vrij staat voor verdere reacties.



Figuur 5: geamineerd NCD-oppervlak

Verschillende moleculen werden al als mogelijke linkermoleculen overwogen, vooral vetzuren en alkenen. Andere moleculen zijn ook mogelijk zoals ethyleendiamine en allylamine. Ethyleendiamine wordt vaak op silica-oppervlakken gebruikt om een NH₂-getermineerd oppervlak te bekomen (14). Zhuang et al. (15) hechtten allylamine reeds met beperkt succes aan gehydrogeneerd polykristallijn diamant via een fotochemische reactie met een beschermde groep over de aminogroep van allylamine, namelijk trifluoroacetamide (TFA). Bij deze methode is er wel een sterke fluorcontaminatie op het oppervlak, wat een slechte zaak is inzake biocompatibiliteit. Zhou et al. (16) probeerden hetzelfde op boor gedopeerd diamant (BDD) met een andere beschermende groep, tert-butylloxycarbonyl (t-BOC), maar slaagden slechts in een gedeeltelijke bedekking van het oppervlak. Verdere optimalisatie is bij beide onderzoeken nog nodig.

In dit onderzoek wordt gekozen voor allylamine of ethyleendiamine als linkermoleculen om verschillende redenen:

- Door de beperkte lengte van deze moleculen blijft de afscheiding tussen het analyt en de transducer klein waardoor de sensitiviteit van de sensor hoog blijft.
- In de literatuur zijn bewijzen te vinden dat allylamine aan NCD kan binden (12,15,16).
- Door de symmetrie van ethyleendiamine zou dit molecuul in principe zelfs nog beter moeten binden, omdat er in dit geval geen competitie is tussen de eindgroepen.

Allylamine of ethyleendiamine kan dus een dunne covalent gebonden aminogetermineerde laag op het NCD-oppervlak vormen die de sensitiviteit van de sensor weinig of niet zal beïnvloeden. Dit zal in deze stage onderzocht en aan de hand van experimenten gestaafd worden.

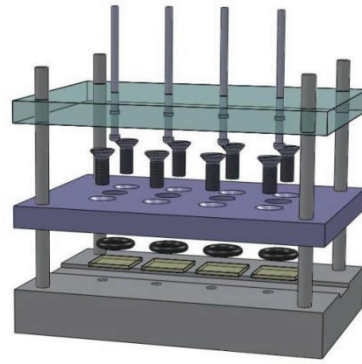
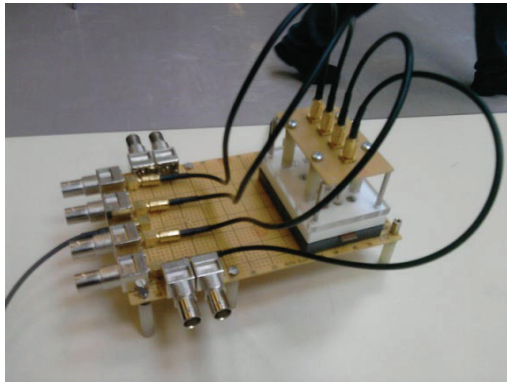
1.5 De uitlezing: elektrochemische impedantie spectroscopie(EIS)

Het uitlezingsysteem bij dit immunosensorplatform is gebaseerd op elektrochemische impedantie spectroscopie (EIS). Bij deze techniek wordt de interface tussen vloeistof en sensoroppervlak beschouwd als een complexe weerstand die bestaat uit passieve elementen zoals weerstanden en lekkende condensatoren. Via elektrische metingen wordt data verzameld over deze interface. Uit deze data kan vervolgens een equivalent elektrisch circuit opgesteld worden, dat een benadering is van het elektrisch gedrag van het sensoroppervlak.

1.6 Optimaliseren van de opstelling

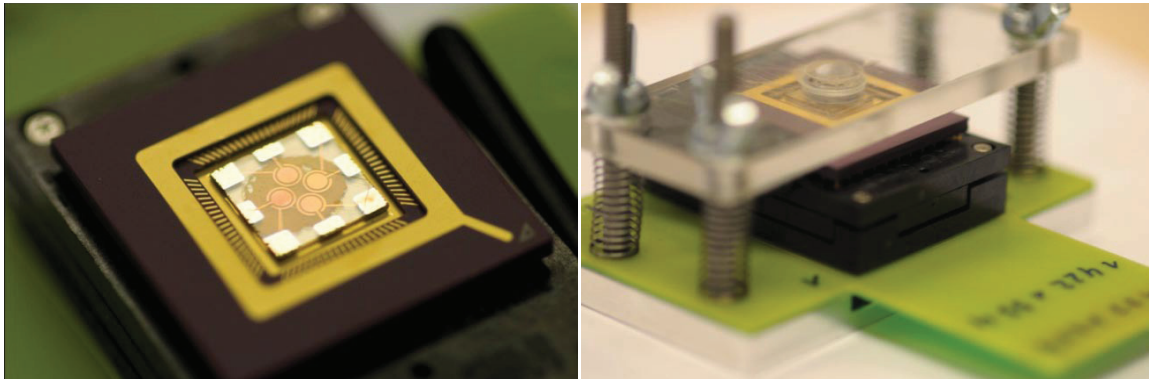
Zoals reeds eerder aangehaald hebben Bijmens et al. EIS op een NCD-gebaseerde CRP-sensor uitgevoerd (4). Zij hebben reeds bewezen dat een *real-time* NCD-gebaseerde CRP-sensor mogelijk is die concentraties kan meten in het gebied grenzend aan medisch relevante concentraties. Voor verdere toepassingen moet de opstelling van de sensor geminiaturiseerd worden. Daartoe worden in dit onderzoek twee aangepaste opstellingen getest: een coplanair design en een *top-down* opstelling. De huidige *top-down* sensor is gebaseerd op een design uit een eerdere studie (17) (

Figuur 6). Deze bestaat uit vier NCD substraten waar een teflon reservoir bovenop geplaatst wordt dat afgedicht is met rubberen ringen. Gouden tegen elektroden worden langs boven in het reservoir aangebracht.



Figuur 6: top-down sensor opstelling

De coplanaire sensor bestaat uit een gepatroneerde NCD-chip waarop NCD elektrodes aangebracht zijn die met TiN of aluminium contacten via *wirebonden* doorverbonden worden aan een chiphouder. Deze laatste staat via een relais en sturingssysteem in verbinding met de impedantiemeter.



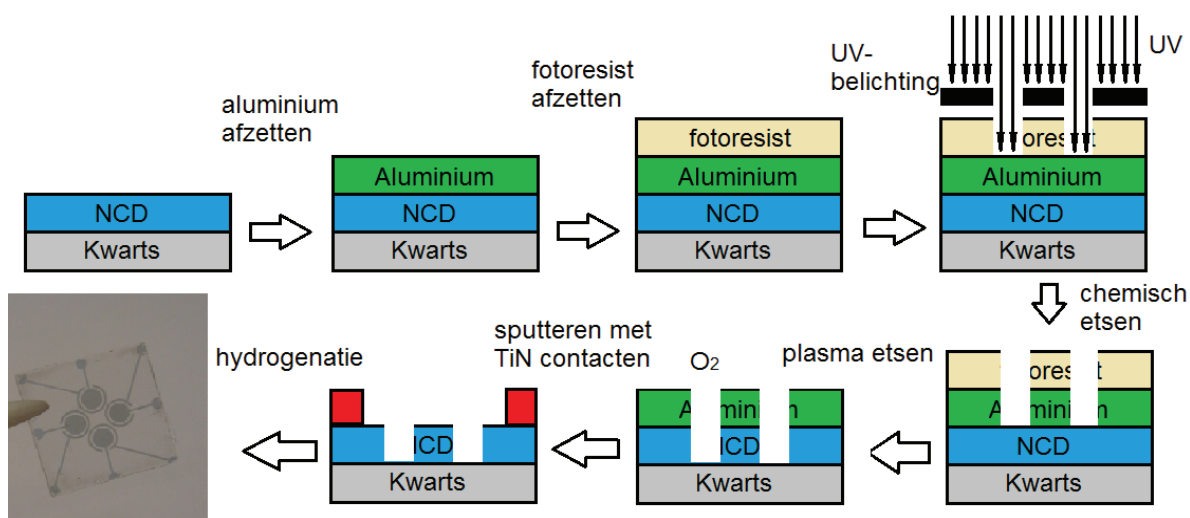
Figuur 7: de coplanaire opstelling

Het belangrijkste voordeel van deze opstelling is dat er 4 identieke elektroden zijn die aan dezelfde vloeistof blootgesteld worden en dus ideaal kunnen vergeleken worden om differentiatiemetingen uit te voeren. Bovendien zijn de array mogelijkheden enorm groot. Eerst moet bevestigd worden dat deze opstellingen werken. Hiervoor worden impedantiemetingen uitgevoerd op niet gefunctionaliseerd diamant (adsorptie gebaseerde metingen) om vergelijkbaar te zijn met eerdere metingen. Eerst worden concentratiereeksen van fosfor buffered saline (PBS) gemeten om de stabiliteit van de sensoren te bevestigen en een equivalent model op te stellen. Daarna volgt een CRP-herkenning, om te bevestigen dat de geminiaturiseerde opstelling werkt en een test van de temperatuursafhankelijkheid.

2 Materiaal en methoden

2.1 Groei van een NCD-substraat

Nanokristallijn diamant wordt als een transducer materiaal gebruikt in de impedimetrische biosensor. Een uniforme NCD-laag wordt gegroeid op een silicium substraat met MWEP-CVD (Figuur 8). Daarbovenop wordt aluminium afgezet. Met een fotoresist wordt een patroon gevormd bovenop het aluminium, en met wet etching wordt dit patroon ook in het aluminium aangebracht. Daarna volgt plasma etching met O_2 . Het diamant dat niet meer bedekt is met aluminium wordt weggeëtsd zodat het patroon ook in het NCD staat. Daarna worden TiN contacten afgezet om een verbinding te vormen met de elektronica. Na annealing volgt een waterstofplasma behandeling om het NCD te hydrogeneren.



Figuur 8: constructieproces van een substraat met coplanaire elektrodes

Zo wordt een gepatroneerd substraat bekomen. Voor het onderzoek naar de functionalisatie van NCD wordt het silica substraat rechtstreeks bedekt met NCD zonder patroon. Voor de impedantiemetingen van de coplanaire sensor worden wel gepatroneerde NCD stalen geproduceerd.

De parameters voor de groei met microwave enhanced CVD van het NCD zonder patroon dat in deze studie gebruikt wordt zijn de volgende: er wordt gewerkt met 2" silicium wafers. De totale concentratie aan methaangas in het gasmengsel voor diamantgroei bedraagt 3 %. Het diamant wordt gedopeerd met boor tot een concentratie van 2000 ppm in het NCD, door toevoegen van trimethyl boraan aan het gasmengsel. De diamantgroei gebeurt bij 685 °C op 50 Torr, bij een vermogen van 4000 W. De basisdruk bedraagt 2×10^{-6} mbar en er wordt 500 s lang gegroeid. De gasverhouding in het totaal is dan $482 H_2/15 CH_4/3 B(CH_3)_3$. Ook wordt er voor sommige metingen commercieel aangekocht diamant van Rho-BeSt (Innsbruck, Oostenrijk) gebruikt.

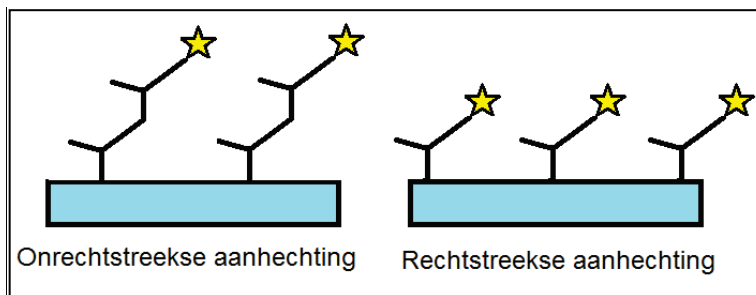
2.2 Optimalisatie van antilichaam adsorptie aan NCD films

2.2.1 Principe

Om de resultaten van de geminiaturiseerde opstellingen te kunnen vergelijken met eerdere resultaten zullen de impedantiemetingen uitgevoerd worden op NCD waarop antilichamen geadsorbeerd zijn. Daarom wordt eerst de adsorptie geoptimaliseerd. De adsorptietesten dienen om de mate van adsorptie van de aangekochte antilichamen aan het NCD te testen, om de fluorescentie intensiteit van geadsorbeerde antilichamen te bepalen als referentie voor later gebruik met een gefunctionaliseerd oppervlak en om te bepalen welke behandeling voor NCD het meest geschikt is voor aanhechting van antilichamen, oxidatie of hydrogenatie.

Door rechtstreekse adsorptie van gelabelde IgG antilichamen (Ab-X) kan bepaald worden hoe sterk de adsorptie aan het NCD-oppervlak is van de Ab-X en om het fluorescentiesignaal van rechtstreekse adsorptie te bepalen. Deze kan vergeleken worden met de fluorescentie bij een herkenningsevent.

Door onrechtstreekse aanhechting, namelijk eerst anti-CRP muis antilichamen (Ab), en daartegen Ab-X, kan de adsorptie van Ab dan bepaald worden en de herkenning tussen Ab en Ab-X. De Ab-X kunnen hebben dus twee mogelijkheden: binden met het NCD of herkenning van de Ab. Hiermee kan dus de biologische functie van de Ab en Ab-X getest worden. Door bleiking kan getest worden of de fluorescentie daadwerkelijk door de geadsorbeerde Ab-X veroorzaakt wordt en of deze geadsorbeerd zijn (Figuur 9).



Figuur 9: onrechtstreekse aanhechting van Ab-X (met sterretje) aan Ab op het oppervlak (links) en rechtstreekse aanhechting van Ab-X (rechts) aan het oppervlak

Deze kennis is noodzakelijk bij binding van antilichamen aan de linkermoleculen. In dat geval moet de adsorptie van antilichamen aan het NCD-oppervlak vermeden worden. Daarvoor is het dus ook belangrijk om te weten welke de basiswaarde is voor adsorptie van antilichamen aan niet-gefunctionaliseerd diamant. Dan kan de fluorescentie intensiteit voor een oppervlak waarop Ab-X geadsorbeerd zijn vergeleken worden met deze van een NCD-oppervlak waarop met linkermoleculen Ab-X of Ab gebonden zijn.

De vergelijking tussen geoxideerd en gehydrogeneerd diamant is gebaseerd op het onderzoek van Nebel et al. (9). In deze proeven worden de bevindingen van Nebel onderzocht, door adsorptie testen uit te voeren met gelabelde antilichamen op geoxideerde en gehydrogeneerde stalen. Ook wordt de biologische activiteit gecontroleerd door een herkenningsevent van Ab door Ab-X uit te voeren op beide oppervlakken.

2.2.2 Materiaal

De gelabelde antilichamen zijn afkomstig van Invitrogen (Merelbeke, België) en zijn van het type geit anti-muis IgG Alexa-488. De antilichamen zelf zijn monoclonale muis anti-CRP van Scipac (Kent, UK). Phosphate buffered saline (10 x PBS: 1,29 M NaCl, 0,05 M Na₂HPO₄·2H₂O, 0,015 M KH₂PO₄) wordt op het IMO zelf bereid. Bovine serum albumine (BSA) is afkomstig van Roche Diagnostics (Vilvoorde, België)

2.2.3 Werkwijze

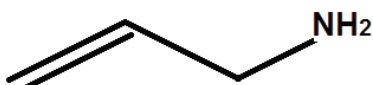
De oxidatie wordt uitgevoerd met een ozoncyclus of via een chemische oxidatie door de stalen 5 min. te plaatsen in kokend zwavelzuur waaraan KNO₃ is toegevoegd ($H_2SO_4 + 2 KNO_3 \Rightarrow 2 HNO_3 + K_2SO_4$ (gas)). De hydrogenatie gebeurt in waterstofplasma bij 700-900°C. Alle stalen, behalve de blanco, worden geïncubeerd met 100 µl van een 3,33 mg/l concentratie Ab-X in 1x PBS. Bij onrechtstreekse adsorptie van de Ab-X wordt eerst 100 µl niet gelabelde antilichamen (Ab) aan het diamantoppervlak gebonden. Deze worden daarna overnacht geblokt in een 6% BSA-oplossing. Na 24 h worden ze geïncubeerd met 3,33 mg/l 100 µl Ab-X.

Na aanhechting worden de stalen bewaard in een 1x PBS-oplossing bij 4°C. De fluorescentie intensiteit van de stalen wordt vervolgens gemeten met fluorescentiespectroscopie. Met bleking van een regio op het staal met confocale fluorescentiespectroscopie kan bepaald worden of de fluorescentie van de Ab-X of van het staal afkomstig is. Dit wordt uitgevoerd door met maximale laserintensiteit en minimale gain driemaal over een bepaalde regio van het staal te schijnen. Door de grote intensiteit wordt snel het einde van de fluorescentieleeftijd van deze moleculen bereikt. Indien het niet om adsorptie maar om achtergrondfluorescentie gaat, zal er geen verschil te zien zijn. Indien het wel om adsorptie gaat zullen de fluoroforen op de Ab-X hun fluorescentie verliezen en zal er in de bestraalde regio geen fluorescentie meer waarneembaar zijn. Met het programma ImageJ kunnen de foto's verwerkt worden.

2.3 NH₂-functionalisatie van NCD

2.3.1 Principe

Antilichamen kunnen niet rechtstreeks een covalente binding vormen met NCD. Hiervoor moet het NCD eerst gefunctionaliseerd worden. Antilichamen kunnen immers enkel adsorberen op gehydrogeneerd of geoxideerd NCD, niet binden. In dit onderzoek wordt het NCD met aminogroepen gefunctionaliseerd. Anti-CRP heeft immers een sterisch vrije carboxylgroep aan het Fc-einde (waarmee het aan het NCD vast geankerd zou kunnen worden). Zo kan er via carbodiimide chemie een binding tussen het aminogetermineerd NCD en het antilichaam gevormd worden.

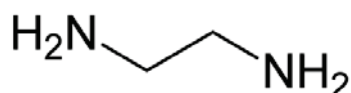


Figuur 10: allylamine

Allylamine (Figuur 10) is een kort organisch molecule met een dubbele binding aan één zijde en een aminogroep aan de andere kant. Niet enkel de dubbele binding van de allylgroep bindt aan NCD bij toevoeging van energie door UV-licht, ook de vrije elektronengroep van de aminogroep kan onder deze omstandigheden een C-N binding vormen. De oriëntatie van de binding wordt dus eerst onderzocht en indien de C-N binding overheerst zal er overgestapt worden op een ander molecule dat ondanks de C-N binding toch nog altijd een aminogroep vrij heeft, namelijk ethyleendiamine.

Een groot nadeel van allylamine is het lage kookpunt (58°C). Als het niet afgesloten wordt dan zal het snel verdampt zijn omdat de temperatuur die opgewekt wordt door de UV lamp 62°C bedraagt.

Het is de bedoeling om een covalente binding tussen NCD en allylamine te vormen en te karakteriseren. Tijdens het onderzoek was het echter tijdelijk onmogelijk om met allylamine verder te werken en werd ethyleendiamine verder gebruikt. Ethyleendiamine bezit twee aminogroepen en hecht dan ook volgens een ander bindingssysteem aan het diamantoppervlak. Omdat ook deze koppelingchemie nieuw is dient er dus een volledig nieuw protocol ontwikkeld en geoptimaliseerd te worden.



Figuur 11: ethyleendiamine

Ethyleendiamine (Figuur 11) is een veelgebruikte bouwsteen in chemische synthese en is dus ruim beschikbaar. Zoals al eerder aangehaald is, kan ethyleendiamine op silica oppervlakken een NH₂-getermineerd oppervlak verwezenlijken. De C-N binding is ook stabielere dan een C-C binding. De

aminogroepen van ethyleendiamine kunnen dus mogelijk ook gemakkelijker binden dan de allylgroep van allylamine. Bovendien is er hier geen competitie tussen de twee eindgroepen.

2.3.2 Materialen

Isopropanol en aceton van technische graad werden besteld bij VWR (België). Research graad allylamine en ethyleendiamine zijn afkomstig van Sigma-aldrich chemie (Duitsland). De UV-lamp werkt bij 254 nm en is van het type UV-C T5 van Philips (4 W) (Nederland). Gelabeld COOH-DNA is afkomstig van de firma Invitrogen (Merelbeke, België)

2.3.3 Werkwijze

De gehydrogeneerde NCD-stalen worden eerst ultrasoon gezuiverd met zeep voor ernstig vervuilde oppervlakken (15 min.), vervolgens met aceton (10 min.) en tenslotte gekookt in isopropanol (10 min./100°C). Net voor aanhechting wordt een contacthoekmeting uitgevoerd. De stalen worden vervolgens overgebracht in een glovebox om onder inerte stikstofatmosfeer te werken. De stalen worden ondergedompeld in allylamine en afgedekt met een UV-transparant kwarts dekglas. Dit dekglas zorgt voor een dunne vloeistoffilm die optimaal blootgesteld wordt aan het UV-licht (Dit werd reeds aangetoond met de aanhechting van vetzuren (18)). Vervolgens worden deze stalen gedurende specifieke tijdsduren belicht met een vermogen van 0,2654 W/cm² (diameter 1,4 cm, lengte 11,3 cm, transmissie kwarts 95 %). Na belichting worden de stalen gewassen in ethanol (2 x 10 min. ultrasoon). Tenslotte wordt de contacthoek opnieuw gemeten. De contacthoek na aanhechting wordt dan vergeleken met de contacthoek voor aanhechting. Aangezien het opstellen van een protocol voor allylamine aanhechting aan NCD één van de objectieven is van deze thesis, zal het exacte protocol besproken worden bij de resultaten.

Eens bewezen is dat een aanhechting mogelijk is, kan het bindingsproces geoptimaliseerd worden. Hiertoe worden de parameters van het proces aangepast volgens een gerichte *trial-and-error* methode. Een eerste parameter is de tijd die het allylamine krijgt om te binden aan het NCD. Hierna wordt getest hoe robuust deze aanhechtingsmethode is. Dit valt te bewijzen door de contacthoeken opnieuw te meten na blootstelling aan de omgevingstemperatuur en de lucht voor een verschillende duur. Een belangrijk probleem bij deze methode is de verdamping van allylamine tijdens de reactie. Het ontwerp van een afgesloten reactiekamer biedt hiervoor een oplossing. Voor ethyleendiamine wordt een gelijkaardige werkwijze gevolgd, maar hier wordt ultrasoon gereinigd met gedemineraliseerd H₂O na aanhechting.

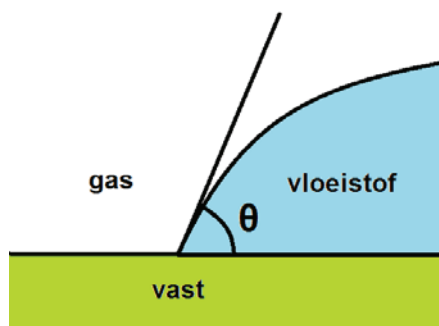
Verder wordt een tweede methode getest om ethyleendiamine als linker te gebruiken. Er wordt getest of ethyleendiamine bindt op vetzuurgetermineerd NCD (10-undecenzuur aanhechting aan NCD (18), standaard protocol). Het gevormde aminegetermineerd oppervlak wordt gekarakteriseerd

door er gelabeld COOH-DNA aan te hechten en dit op te meten met confocale fluorescentie. De ethyleendiamine wordt aan de carboxylgroep van het vetzuur gehecht met een EDC/NHS-protocol volgens Dynal (19), en vervolgens wordt met een gemodificeerd protocol het gelabeld DNA aan het diethylamine-10-UDA-NCD gehecht. Zo kan de bruikbaarheid van ethyleendiamine als linker voor biomoleculen rechtstreeks getest worden. Later kan dit gelabeld COOH-DNA ook op allylamine getermineerde oppervlakken getest worden.

2.4 Contacthoekmetingen

2.4.1 Principe

De contacthoek is in dit geval de hoek die gevormd wordt tussen de vloeistof en de vaste stof bij een vloeistof/vaste stof interface. Een hoge contacthoek betekent weinig affiniteit van de vloeistof voor het oppervlak van de vaste stof. Een lage contacthoek betekent een hoge affiniteit, of hoge graad van 'wetting' (Figuur 12).



Figuur 12: contacthoek tussen vloeistof en vaste stof

Als er dus een druppel water op het NCD-oppervlak valt, bepaalt de hydrofiliciteit van het NCD of deze druppel een grote of kleine contacthoek maakt met het NCD-oppervlak. Om dit op te meten wordt een contacthoekmeter (Figuur 13) gebruikt. Een camera legt het beeld vast van de scheiding tussen druppel en oppervlak en met de software wordt de hoek hiertussen berekend. Dit is een zeer gevoelige techniek, en door het kleine volume van de waterdruppels zijn omgevingstemperatuur, staat van het oppervlak en plaats waar de druppel valt van zeer groot belang, evenals de zuiverheid van het te meten oppervlak.



Figuur 13: de contacthoekmeter (20)

2.4.2 Toepassing

De contacthoeken worden gemeten voor en na aanhechting van een linkermolecule zoals allylamine of ethyleendiamine. Eerst wordt getest of allylamine bindt met NCD. Dan wordt getracht te achterhalen welke binding gevormd wordt tussen allylamine en NCD. Deze twee testen worden tegelijk uitgevoerd. Contacthoekmetingen kunnen hier een beter inzicht verschaffen. Indien allylamine niet bindt, verandert de contacthoek niet voor en na incubatie. Indien allylamine bindt met de aminokant, ligt de dubbele binding vanboven. Deze is hydrofober dan het diamantoppervlak en dus stijgt de contacthoek. Bij de gewenste binding van de dubbele binding met het NCD-oppervlak, wordt het oppervlak hydrofieler en zal dus de contacthoek dalen.

2.4.3 Materiaal

De contacthoekmeter is de contact angle system OCA van Dataphysics, Duitsland.

2.4.4 Werkwijze

Voor de meting is het belangrijk dat de stalen proper zijn, het zuiveringsprotocol uit 0 wordt gevolgd. Een waterdruppel van 1 μl wordt op het NCD-staal geplaatst en de meting start. Er worden opname series van 20 tot 30 seconden gemaakt. Zodra er een lineair verval waarneembaar is worden deze datapunten verwerkt tot een gemiddelde. De eerste meetpunten kunnen grote variatie vertonen door verschuivingen van de druppel en doordat de software eerst ruw meet na de start. Na een bepaalde tijd worden de metingen onnauwkeurig door verdamping. Het verschil in contacthoek voor de aanhechting en erna wordt uitgezet in een grafiek.

2.5 Impedantiemetingen

2.5.1 Principe

Volgens de wet van Ohm is $R = U/I$. Deze vergelijking is echter enkel geldig voor een ideale weerstand. In de realiteit wordt gewerkt met systemen die deze relatie niet volledig volgen of soms zelfs helemaal niet volgen. Vandaar dat gewerkt wordt met impedantie. Impedantie is de mate waarin een circuit de stroom hindert.

Bij impedimetrie wordt de impedantie bepaald door een AC potentiaal aan te leggen en dan de stroom door het circuit op te meten. Als er een AC potentiaal wordt aangelegd, zal de resulterende stroom een AC stroom zijn. In een lineair of pseudolineair systeem is de respons op een sinusoidale potentiaal een sinusoidale stroom bij dezelfde frequentie maar met een faseverschuiving:

$E_T = E_0 \sin(\omega t)$ met E_0 de amplitude, E_t de potentiaal op tijd t en ω de radiale frequentie.

In een lineair systeem is het resulterende stroomsignaal I_t gegeven door:

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \phi)$$

Als we dit invullen in de wet van Ohm krijgen we:

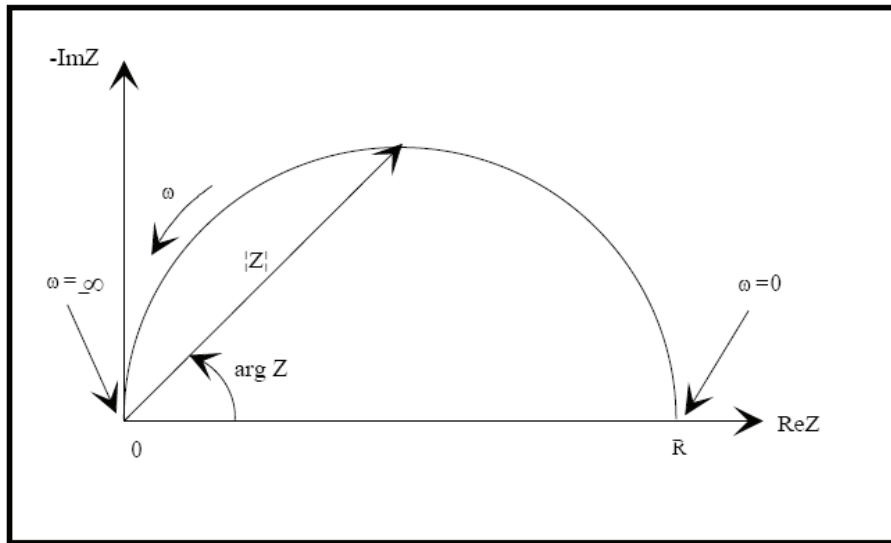
$$Z = E_t/I_t = E_0 \sin(\omega t) / I_0 \sin(\omega t + \phi)$$

Via de wet van Euler ($\exp(j\phi) = \cos\phi + j\sin\phi$) kunnen we de impedantie dan ook als een complex getal schrijven nl.:

$$Z(\omega) = E/I = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0 (\cos\phi + j\sin\phi)$$

Om deze data op een duidelijke manier grafisch weer te geven, gebruikt men een Nyquist plot (Figuur 14). In deze curve wordt het reële deel van de impedantie op de x-as gezet en het imaginaire deel op de y-as. Het kan ook beschreven worden als de amplitude en de fase van een frequentierespons in een polair coördinatensysteem (21).

Er is software beschikbaar om Nyquist plots te passen in modellen voor verschillende soorten equivalente circuits. Verder kunnen ook nog Bode plots toegepast worden. Deze curven geven de fase of de amplitude in functie van de frequentie weer voor één bepaalde impedantiemeting. Zo kan achterhaald worden of het gedrag van de opstelling resistief of eerder capacitief is. Capacitaire impedanties zorgen immers voor een negatieve faseverschuiving, terwijl resistieve impedanties in fase liggen met het ingevoerd signaal. Bij frequenties waar de fase naar negatievere waarden verschuift, en de modulus hoog is, is het gedrag vooral capacitief, bij frequenties met hoge modulus en fase rond de 0° is het gedrag eerder resistief. Voor een meer diepgaande bespreking zie bijlage.



Figuur 14: voorbeeld van een Nyquist plot (21)

Er wordt gewerkt met twee opstellingen. De *top-down* opstelling heeft vier meetkanalen, en de coplaire opstelling heeft vier elektroden (Figuur 6 en 7). Bij een impedantiemeting wordt sequentieel elk van de 4 kanalen gemeten met een interval tijd van 30 seconden. Dit is zodanig snel dat er bijna simultaan gemeten wordt. Elk kanaal ondervindt een wisselspanning die een vooraf gedetermineerde frequentiesweep doorloopt. De aangelegde spanning resulteert vervolgens in een wisselstroom die een andere amplitude en een zekere faseverschuiving heeft ondervonden. Deze gegevens worden geregistreerd en kunnen later verwerkt worden zoals hierboven beschreven.

In het werk van Bijmens et al. werd een specifieke herkenning door geadsorbeerde anti-CRP antilichamen steeds geassocieerd met een stijging van de impedantie. Dit komt door een verlaagde capacitantie van de moleculaire laag door CRP-binding. Niet-specifieke condities werden geassocieerd met lagere impedantiedalingen (4).

2.5.2 Materialen

De impedantiemeter is van Hewlett Packard en van het type 4194A Impedance/Gain-phase analyzer. De data wordt opgenomen met het programma Labview 7.5 van National Instruments (België).

2.5.3 Werkwijze

Impedantiemetingen zijn gevoelige metingen die zeer veel informatie verschaffen over de te meten opstelling. Om deze informatie zo juist mogelijk te verkrijgen dient er vooraf een kalibratie uitgevoerd te worden waarin alle storende elementen weg gerekend worden. De kalibratie gebeurt hardwarematig door een open en een gesloten circuit op te meten. Na het monteren van de coplaire of *top-down* opstelling worden ze blootgesteld aan de vloeistof en kunnen ze stabiliseren.

2.5.4 Toepassing

De top-down opstelling

Bij de *top-down* opstelling is een karakterisatie van de opstelling al uitgevoerd. Hier is nog een optimalisatie van het opmeten van het bindingsevent nodig. In het verleden werd met deze opstelling reeds een CRP-detectie uitgevoerd in buffer (22). Dit betekent dat de impedantiemetingen nog in serum moeten worden opgemeten. De sensor wordt dus uitgerust met NCD bedekt met (geadsorbeerd) anti-CRP. Dan wordt het bindingsevent opgevolgd van de anti-CRP op het NCD met de toegevoegde CRP in serum. Hiertoe wordt de sensor in een stabiele omgeving geplaatst, de *wells* worden met serum gevuld, en wordt gewacht tot de sensor gestabiliseerd is. Daarna wordt dan in enkele *wells* CRP/serum toegevoegd en het impedantiesignaal wordt dan geïnterpreteerd. Deze experimenten worden uitgevoerd in een oven op 37° C, waarbij het vochtgehalte controleerbaar was.

De coplanaire opstelling

Om een verbinding te verkrijgen tussen de TiN contacten op het NCD-staal en de impedantiemeter moet er een draadje gelegd worden tussen de chip en de contacten van de chiphouder. *Wirebonden* is de naam van de techniek die hiervoor gebruikt wordt. Met *wirebonden* wordt een las gemaakt tussen een draadje, in dit geval van aluminium, en het contact waar het op gedrukt wordt door een combinatie van druk en ultrasone trillingen.

Voor array metingen moeten de NCD-stalen meerdere kanalen bezitten. Dit is de reden voor de productie van de gepatroneerde NCD-stalen. Verschillende designs zijn hier mogelijk, maar er moet steeds opgelet worden dat de stroom over de gehele lengte van de elektrode wordt verdeeld en dat er geen opladingeffecten plaatsvinden. De designs worden uitgevoerd met het designprogramma Clewin4 van Wieweb software (Nederland) op de gebruikelijke 1 x 1 cm chips dus er moet ook rekening gehouden worden met minimumafmetingen van de elektrodes om een nauwkeurige afzetting te bekomen.

Om de coplanaire opstelling uit te testen zijn verschillende metingen nodig. De opstelling moet gekarakteriseerd worden om een equivalent circuit op te stellen. Daarvoor worden verschillende metingen uitgevoerd: er wordt bepaald of een verschillende oscillatiespanning of biasspanning een invloed heeft. De invloed is eenvoudig te bepalen door de oscillatiespanning of biasspanning te variëren en de impedantieresultaten te vergelijken met de basisspanning.

Verder is van belang wat de reacties zijn van het systeem op kalibratie met doorverbindingen, een kortgesloten chip, en met weerstanden met verschillende grootte. Hiervoor worden de contacten

van een chiphouder onderling doorverbonden door *wirebonden*. Ook wordt de chip zowel nat (met PBS-buffer) als droog opgemeten. Metingen van concentratiereeksen bepalen of de sensor gevoelig is voor concentratieveranderingen. Een concentratiereeks wordt opgesteld gaande van 0,001x PBS tot 10x PBS.

Verder moet de temperatuurgevoeligheid van deze sensor nog beproefd worden. Hiervoor wordt de opstelling in een oven geplaatst en deze oven wordt geprogrammeerd volgens een temperatuurprogramma. Vervolgens worden de reacties van de impedantie op de temperatuurveranderingen opgevolgd, en er wordt bepaald of de impedantieveranderingen significant zijn.

3 Resultaten

3.1 Fluorescentiemetingen van antilichaamadsorptie

Met de adsorptiemetingen wordt bevestigd welk type diamant (gehydrogeneerd of geoxideerd) het meest geschikt is voor antilichaamadsorptie. Bovendien wordt hier de fluorescentie intensiteit bepaald van een rechtstreekse aanhechting van gelabelde antilichamen (NCD—Ab-X). Vervolgens wordt een onrechtstreekse aanhechting (NCD—Ab—Ab-X) uitgevoerd ter referentie voor metingen in de toekomst met gelabeld aminoetermineerd diamant. Alle Ab-X in dit onderzoek zijn geit anti-muis IgG Alexa-488.

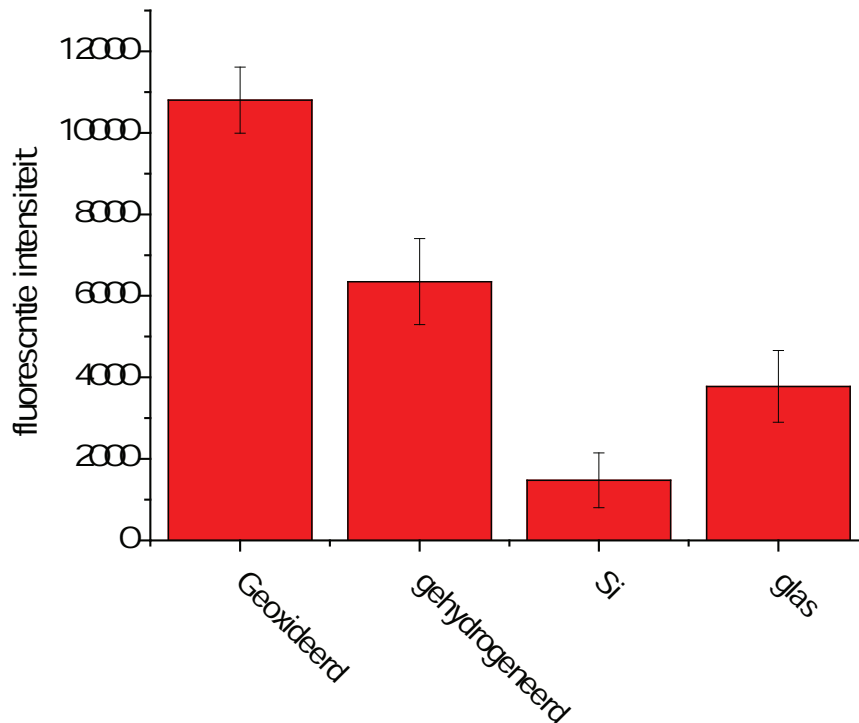
3.1.1 Vergelijking tussen gehydrogeneerd en geoxideerd NCD

Om te weten welke behandeling het meest geschikt is voor diamant voor gebruik met de fysisorptie gebaseerde sensor (gehydrogeneerd of geoxideerd), moet vergeleken worden aan welk oppervlak de antilichamen het best adsorberen.

In een eerste meting wordt bepaald of de antilichamen beter adsorberen aan gehydrogeneerd of geoxideerd NCD. Hiervoor wordt de fluorescentie intensiteit van de adsorptie van de Ab-X aan het diamant van Biomed (geoxideerd commercieel UNCD van Rho-Best) en het IMO (gehydrogeneerd) vergeleken. Deze resultaten worden op hun beurt vergeleken met adsorptie op silicium en glas ter referentie. Het doel is om te bepalen welk type het meest geschikt is om antilichamen te adsorberen voor gebruik met de fysisorptie gebaseerde opstelling. De antilichamen worden hiervoor geïncubeerd met 100 µl van 2,22 mg/l Ab-X in 1x PBS voor 2 uur aan lichaamstemperatuur. De resultaten zijn in onderstaande grafiek weergegeven (Figuur 15).

Tabel 1: resultaten van de vergelijking van de Ab-X aanhechting (2,22 mg/l) aan verschillende materialen

Biomed	10 803	1 626
Imo	6 350	1 080
Silicium	1 473	678
Glas	3 779	889



Figuur 15: fluorescentie intensiteit door adsorptie van Ab-X in functie van de gebruikte materialen

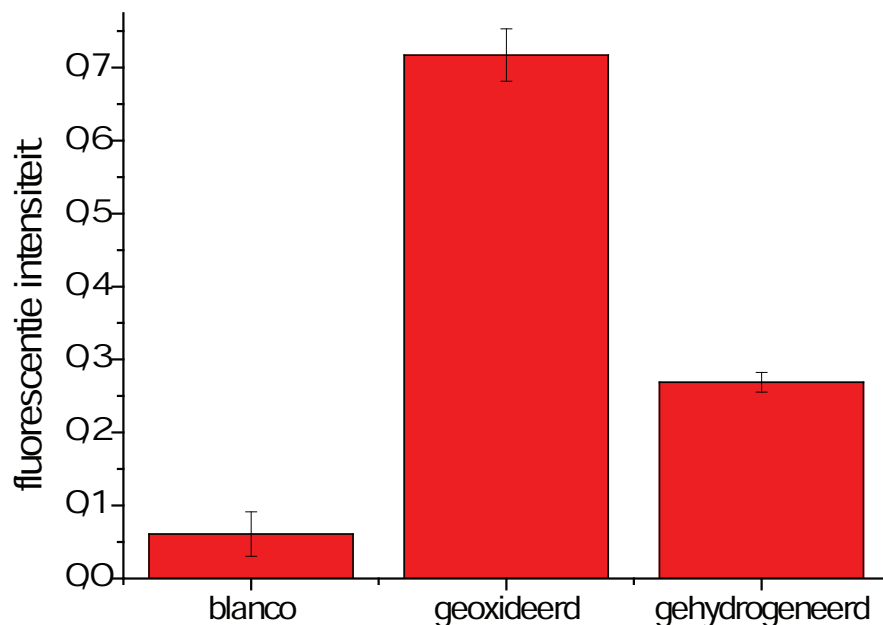
Zoals te zien in de figuur vertoont de geoxideerde NCD een significant grotere adsorptie dan de gehydrogeneerde NCD van het IMO. Het verschil tussen de gehydrogeneerde NCD en glas is dan weer kleiner. Silicium heeft de laagste adsorptie. Deze resultaten bevestigen de bevindingen van Nebel (9).

Een tweede vergelijking tussen de adsorptie aan gehydrogeneerd en geoxideerd diamant kan bepaald worden met een ELISA-test. In deze test wordt een herkenning van antilichamen gevolgd op twee verschillend behandelde stalen, dus kan de biologische werking over de twee stalen gevolgd worden. Twee UNCD stalen van Rho-Best worden vergeleken. De ene is gehydrogeneerd, de andere is chemisch geoxideerd.

Twee stalen worden geïncubeerd voor 15 min. met monoclonale muis Ab (Scipac, Kent) om dan geblokt te worden met BSA en vervolgens 1 u blootgesteld te worden aan Ab-X. De concentraties zijn overeenkomstig met een basisprotocol voor ELISA van Biomed. Hier zijn de geoxideerde stalen geproduceerd door chemische oxidatie i.p.v. met de ozoncyclus (Figuur 16).

Tabel 2: vergelijking van de fluorescentie intensiteit na adsorptie van Ab-X aan geoxideerd en gehydrogeneerd NCD

blanco	0,061	0,03050
geoxideerd	0,717	0,03585
gehydrogeneerd	0,269	0,01345



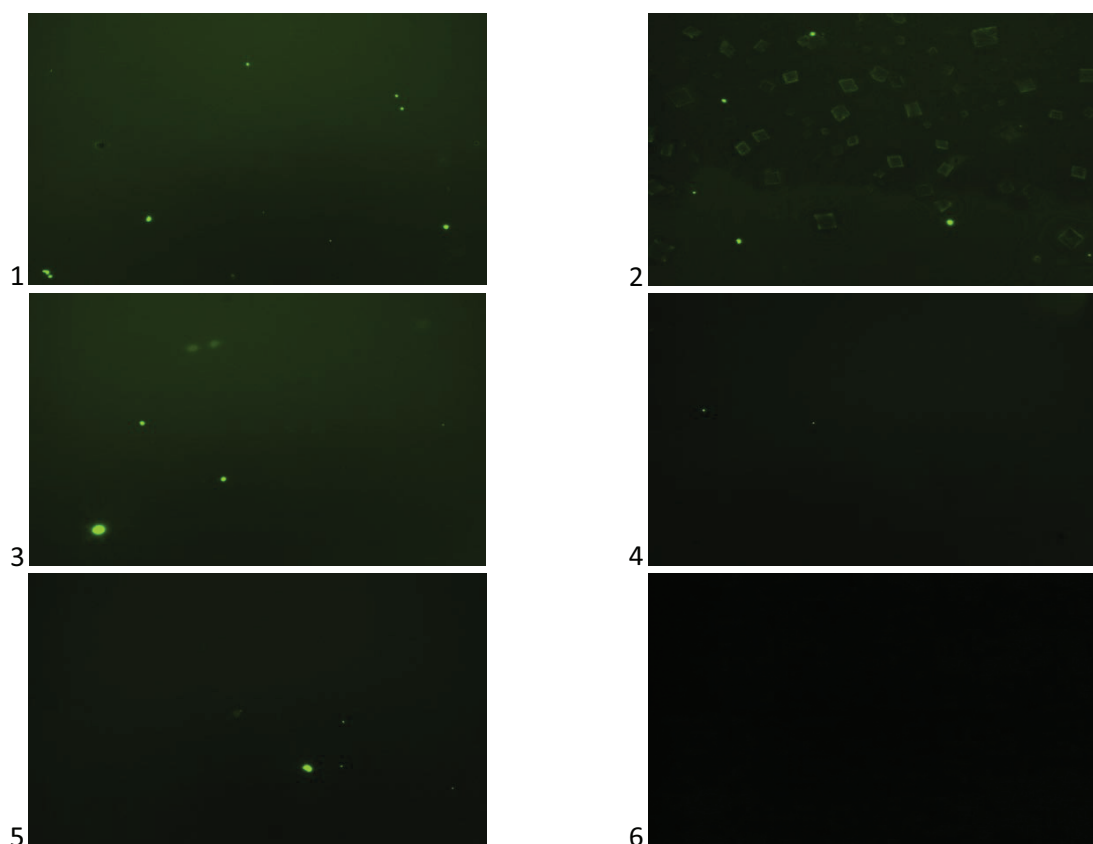
Figuur 16: vergelijking geoxideerd/gehydrogeneerd

Hier is duidelijk te zien dat de geoxideerde stalen een grotere fluorescentie intensiteit vertonen dan de gehydrogeneerde. Dit betekent dat er meer Ab-X stalen gebonden zijn met Ab op het geoxideerde staal. Er zijn dus meer Ab op het NCD geadsorbeerd bij het geoxideerde NCD, waarop de Ab-X kunnen binden. Door de betere adsorptie van antilichamen op geoxideerd NCD is de biologische activiteit beter gegarandeerd op geoxideerd NCD. Dit bevestigt de bevindingen van Nebel et al. (9) en we zijn dan ook verder van zijn onderzoek uitgegaan voor de adsorptie-eigenschappen

3.1.2 Fluorescentietesten van de antilichamen

In een tweede test worden fluorescent gelabelde antilichamen rechtstreeks geadsorbeerd aan het geoxideerd NCD-oppervlak. Ten eerste bepaalt deze test de mate waarin Ab-X rechtstreeks aan het NCD-oppervlak adsorberen. Ten tweede wordt bepaald wat de fluorescentie intensiteit van een oppervlak bedekt met gelabelde antilichamen is ter referentie. Tenslotte kan deze intensiteit later vergeleken worden met de intensiteit van aminogetermineerd NCD dat geïncubeerd wordt met Ab-X.

In deze test wordt dus bepaald hoe sterk de Ab-X adsorberen aan NCD na verschillende incubatietijden. Hiervoor worden de Ab-X in een concentratie van 3,33 mg/l in 1x PBS rechtstreeks op geoxideerd diamant geïncubeerd. De geoxideerd stalen worden met druppels van 100 µl geïncubeerd voor 5, 10, 30 of 60 min (Figuur 17 en 18).

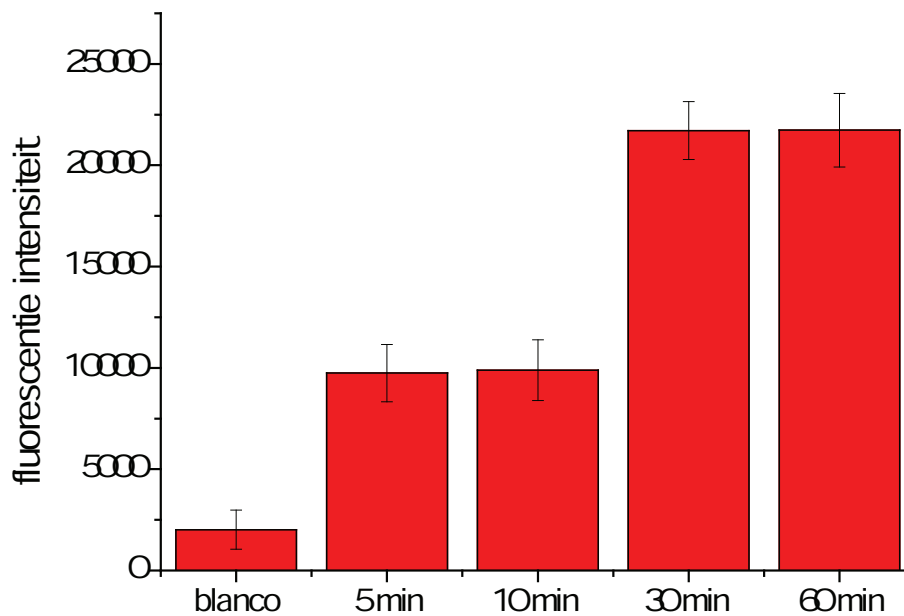


Figuur 17: Foto's van de adsorptie van Ab-X aan geoxideerd NCD. Druppels van 100 µl van een concentratie van 3,33 mg/l Ab-X in 1x PBS worden gepipetteerd op het NCD oppervlak. Stalen 1 en 2 werden 60 min. geïncubeerd met Ab-X. Staal 1 werd in 1 x PBS bewaard, staal 2 werd droog bewaard. Staal 3 werd 30 min. geïncubeerd. Staal 4 voor 10 min. Staal 5 voor 5 min. En staal 6 is een blanco staal dat 60 min. in 1x PBS heeft gestaan.

Op foto 2 is duidelijk te zien waarom de stalen na incubatie in buffer bewaard moeten worden: de antilichamen clusteren en hechten zich aan de randen van kristallen op het NCD-oppervlak i.p.v. zich als een laag af te zetten. Ook duidelijk zichtbaar op de foto's is de afnemende intensiteit met de afnemende incubatietijd.

Tabel 3: de fluorescentie intensiteit in functie van de incubatietijd voor de adsorptie van Ab-X aan geoxideerd NCD

60 min Ab-X	21730	1813
30 min Ab-X	21713	1425
10 min Ab-X	9892	1497
5 min Ab-X	9744	1418
blanco	2012	966



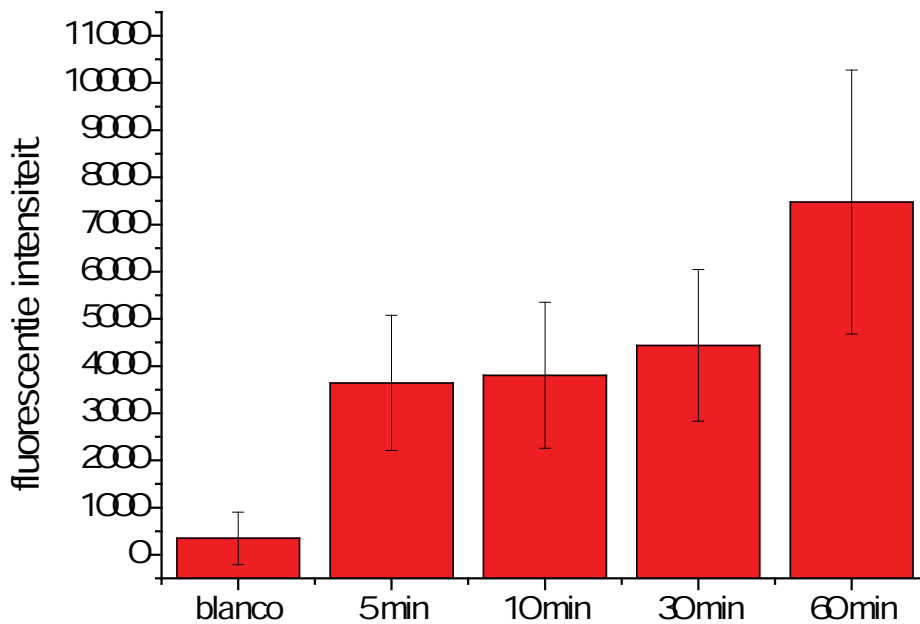
Figuur 18: de fluorescentie intensiteit in functie van de incubatietijd voor de adsorptie van Ab-X aan geoxideerd NCD

Na 30 min incubatietijd blijkt dat er een duidelijke adsorptie aan het oppervlak is, de adsorptie verdubbelt t.o.v. 10 en 5 min incubatie. Er lijkt geen significant verschil waarneembaar bij incubatietijden langer dan 30 min, de intensiteit bij 60 min. incubatie is even hoog en vertoont een vergelijkbare standaarddeviatie. Zelfs bij lage incubatietijden is een ruim verschil in fluorescentie intensiteit met de blanco te meten.

In een volgende test wordt een aanhechting in twee stappen uitgevoerd aan het NCD. Eerst hechten Ab aan het oppervlak en daartegen hechten de Ab-X die specifiek zijn voor deze Ab. Hiermee kan de adsorptie van de Ab getest worden en de specificiteit van de Ab-X voor de Ab, dit is dus ook een kwaliteitstest voor de Ab-X (dit zijn dus eigenlijk anti-Ab). Omdat de Ab-X ook aan het oppervlak kunnen hechten, wordt er na Ab-aanhechting overnacht geblokkeerd met bovine serum albumine (BSA). Eerst wordt 100 µl Ab gehecht aan het geoxideerde diamant voor 5, 10, 30 of 60 min. Na overnacht blokken met BSA worden de stalen één uur geïncubeerd met Ab-X (Figuur 19).

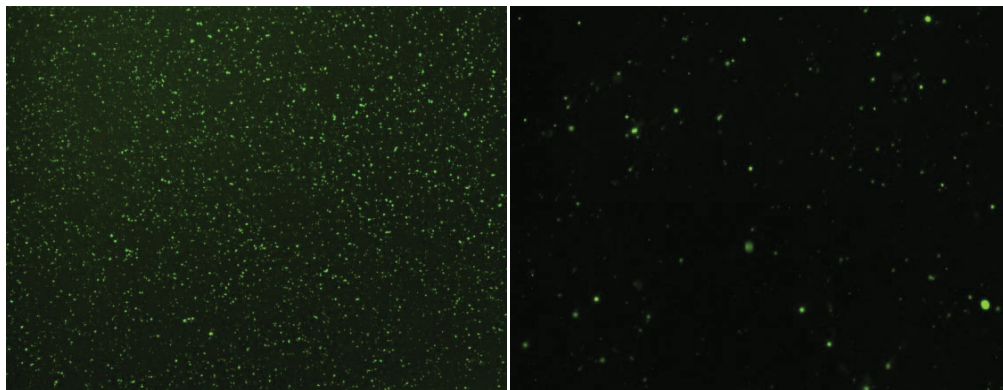
Tabel 4: de fluorescentie intensiteit in functie van de incubatietijd voor de adsorptie van Ab (Ab—Ab-X) aan geoxideerd NCD

60 min	7476	2799
30 min	3802	1608
10 min	4435	1548
5 min	3642	1431
blanco	347	554



Figuur 19: de fluorescentie intensiteit in functie van de incubatietijd voor de adsorptie van Ab (Ab—Ab-X) en de herkenning van Ab door Ab-X aan geoxideerd NCD

Uit deze curve blijkt dat er een grote variatie zit op de fluorescentie. Dit komt door clustering van de antilichamen (Figuur 20). Er is dus geen evenredige verdeling over het oppervlak.



Figuur 20: clustering van antilichamen bij metingen op NCD—Ab—Ab-X, links 60 min. Incubatie met Ab, rechts 30 min.

Op de figuur is duidelijk te zien hoe de antilichamen zich in kleine centra verzamelen. Aan de cijfers van de intensiteit valt ook te zien dat deze veel lager is dan van een evenredig bedekt oppervlak met even grote incubatietijd. Er zijn twee mogelijkheden: de Ab-X kunnen eerder aan elkaar hechten dan aan de Ab, of de Ab hechten vooral in clusters, waardoor de Ab-X zich daar ook rond clusteren tot kleine intense centra.

3.2 Functionalisatie van NCD

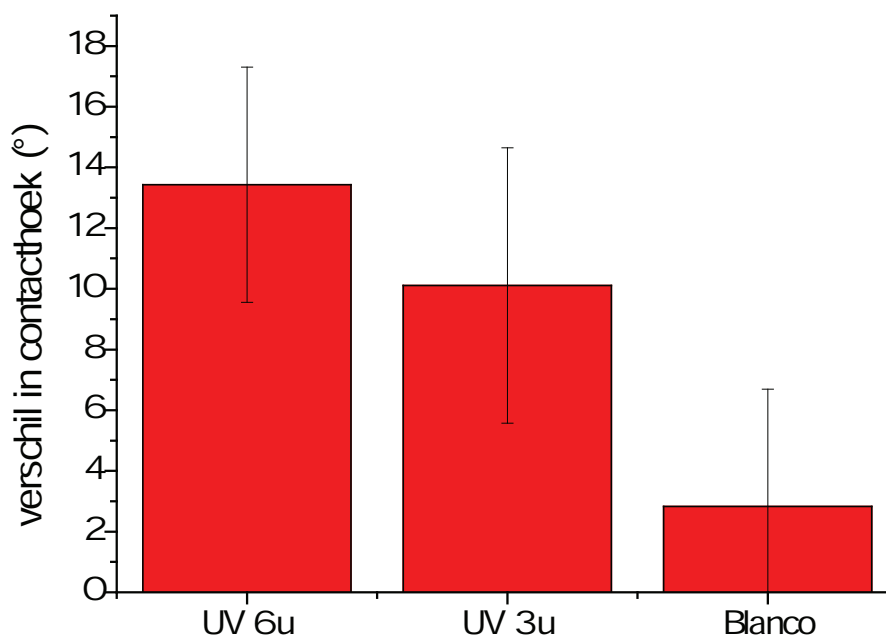
3.2.1 Functionalisatie met allylamine

Voor de functionalisatie van de NCD-laag met aminogroepen wordt allylamine getest als mogelijke linkermolecule. Al deze metingen worden uitgevoerd op gehydrogeneerd NCD. De contacthoek voor onbehandeld gehydrogeneerd NCD ligt tussen 82° en 95°.

Al bij de eerste testen blijkt dat allylamine gemakkelijk verdampt in de reactiekamer. Dit wordt veroorzaakt door het lage kookpunt van allylamine (53 °C) en door de warmte afkomstig van de UV-lamp. De opstelling die normaal voor aanhechting met UV aan diamant gebruikt wordt is onvoldoende om verdamping van het allylamine tijdens de belichtingstijd te voorkomen. Bij metingen van de contacthoek van stalen behandeld met UV in de opstelling waar enkel een kwartsglaasje over de stalen ligt, blijkt dat de standaarddeviatie zeer groot is, en dat het verschil in contacthoek kleiner is dan verwacht (Figuur 21). Bij het uithalen van de stalen uit de UV-reactiekamer blijkt het allylamine ook telkens verdampt te zijn. In de eerste metingen met deze opstelling worden belichtingstijden van 3u en 6u getest.

Tabel 5: gemiddelde contacthoekverschil voor 3u en 6u UV-belichting van allylamine op gehydrogeneerd NCD

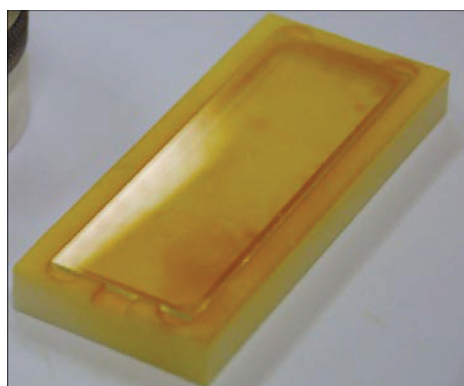
UV 6 u	13,43	3,874844608
UV 3 u	10,11	4,534936604
no UV	2,83	3,856947216



Figuur 21: meting van het verschil in contacthoek bij aanhechting van allylamine aan gehydrogeneerd NCD voor 3 u en 6 u UV-belichting met de oude opstelling

In figuur 18 is duidelijk te zien dat de standaarddeviatie van deze metingen groot is. Aangezien op de blanco al een variatie zit van 0-7,5° verschil in contacthoek is een contacthoekverschil van 10 of 13° ook zeer klein en lager als verwacht. Bij een correcte aanhechting moet het verschil in contacthoek minstens 20° bedragen om significant te zijn.

Om de verdamping van allylamine te voorkomen wordt een kleine reactiekamer uit teflon ontwikkeld. De reactiekamer bestaat uit een reservoir gemaakt uit teflon waarin allylamine gepipetteerd kan worden en waarin de stalen dan ondergedompeld liggen. De bovenkant van het reservoir kan afgesloten worden door er een kwartsglas over te leggen (Figuur 22). Met deze opstelling wordt verder gewerkt voor volgende experimenten.

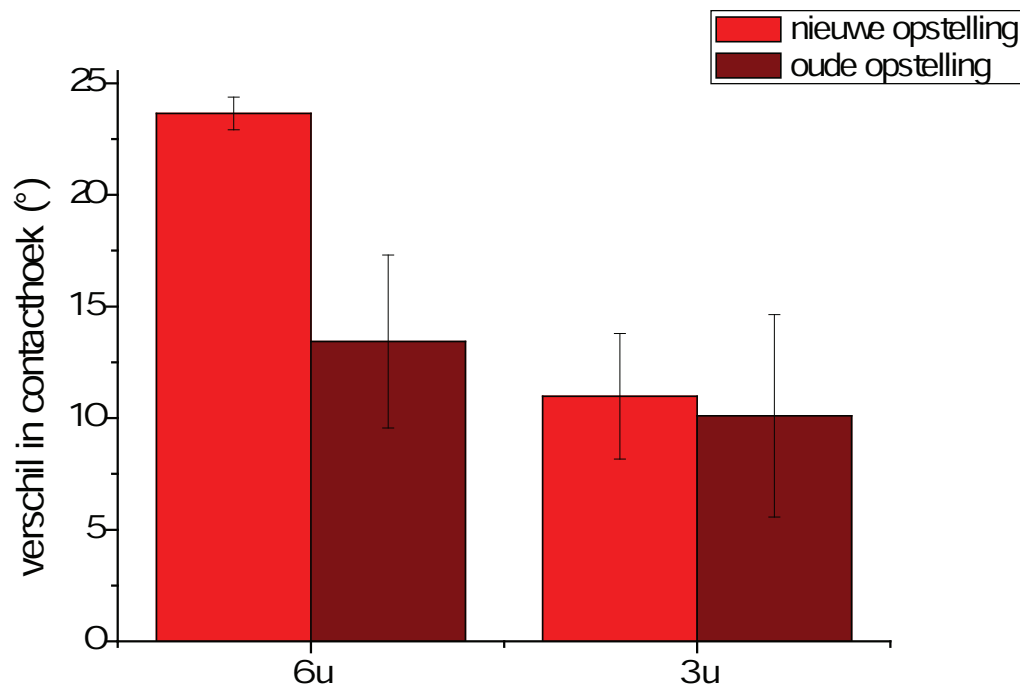


Figuur 22: Teflon reservoir

Deze opstelling wordt onmiddellijk vergeleken met de oude opstelling door voorgaande experimenten te herhalen. De resultaten worden in onderstaande curve vergeleken (Figuur 23).

Tabel 6: : vergelijking tussen het contacthoekverschil voor en na allylamine aanhechting aan gehydrogeneerd NCD bij de oude opstelling en de nieuwe opstelling voor de experimenten met 6u en 3u UV-belichting

6 u nieuw	23,65	0,729873
6 u oud	13,43	3,874844608
3 u nieuw	10,11	2,814229404
3 u oud	10,11	4,534936604
no UV	2,83	3,856947216



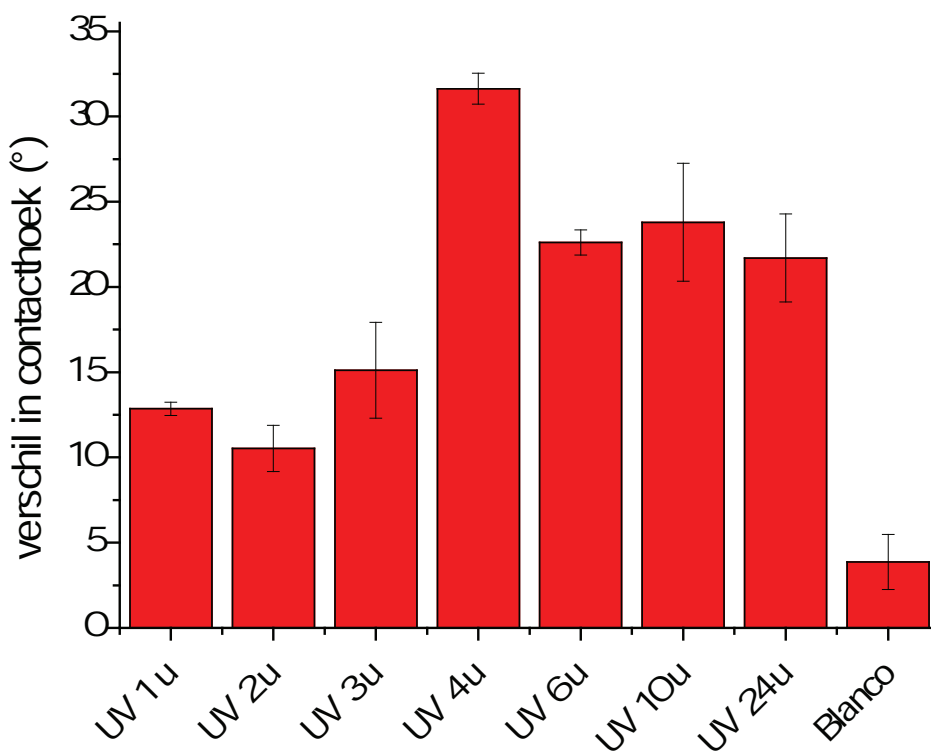
Figuur 23: vergelijking tussen het contacthoekverschil voor en na allylamine aanhechting aan gehydrogeneerd NCD bij de oude opstelling en de nieuwe opstelling voor de experimenten met 6u en 3u UV-belichting

Bij 3u belichting met UV is er weinig verschil tussen de oude en de nieuwe opstelling, maar dit komt omdat 3u belichting te kort is voor allylamine aanhechting, wat op het moment van de meting nog niet bekend was. Bij 6 u belichting is een duidelijk verschil te zien in verandering van contacthoek in vergelijking met de oude opstelling. Het contacthoekverschil verdubbelt hier bijna. De nieuwe opstelling is dus duidelijk beter geschikt voor allylamine aanhechting, door verminderen van de verdamping. Bovendien valt hier onmiddellijk op dat het contacthoekverschil positief is: de contacthoek daalt dus na aanhechting. Dit betekent dat allylamine met de allylkant aanhecht, zoals gehoopt.

Een volgende reeks experimenten vergelijkt de binding van allylamine aan het NCD-oppervlak voor een verschillende belichtingsduur met UV (Figuur 24). De belichtingsduur is immers de belangrijkste parameter voor de aanhechting, aangezien zij een indicatie is voor de energie nodig voor de binding.

Tabel 7: vergelijking tussen verschillende tijden voor UV-belichting van NCD-stalen bedekt met allylamine

UV 1 u	12,85	0,38167	96,66194	83,80750
UV 2 u	10,53	1,36000	82,33333	71,80333
UV 3 u	15,11	2,81423	79,33368	64,22553
UV 4 u	31,63	0,90000	84,16917	52,53694
UV 6 u	22,61	0,72987	88,98273	66,37273
UV 10 u	23,79	3,46188	94,74417	70,95278
UV 24 u	21,70	2,58391	91,33444	69,63433
no UV	3,86	1,61583	84,54500	80,68736



Figuur 24: invloed van de belichtingsduur op de aanhechting van allylamine op gehydrogeneerd NCD, bepaald met contacthoekmetingen. Deze metingen zijn op verschillende tijdstippen uitgevoerd. Het blanco staal is het gemiddelde van alle blanco's die bij deze metingen opgemeten zijn.

Op de curve is te zien dat bij belichting korter dan 4 u nooit meer als 20° verschil gemeten wordt in contacthoek. Metingen langer als 4 u komen wel boven de significante grens voor contacthoekmetingen van 20° uit. Dit betekent dat bij belichtingsduren korter als 4 u, er door competitie een hogere contacthoek wordt gemeten als verwacht, of dat er in deze tijd nog te weinig energie is geleverd voor een covalente binding met de allylgroep. Alleen bij belichtingstijden vanaf 4 u is dus een duidelijke mate van binding van het allylgedeelte van allylamine aan het NCD aanwezig. De meting van 4 u heeft het grootste verschil in contacthoek, verdere metingen hebben weer een

lagere contacthoek. Dit kan twee oorzaken hebben: zoals hierboven reeds aangehaald verdampt er toch een relatief grote fractie van het allylamine, en het kan zijn dat stalen die meer als 4 u belicht worden niet meer volledig bedekt worden met vloeistof tijdens de belichting. Ten tweede staat de UV-lamp vrij dicht bij de stalen en heeft zo een vrij grote intensiteit per cm^2 . Het kan zijn dat deze grote intensiteit destructief is voor het allylamine, of voor de binding tussen allylamine en NCD. Met deze opstelling is 4u onder de UV-lamp dus de optimale belichtingsduur. Bij deze belichtingsduur is $31,63^\circ$ het gemiddelde verschil in contacthoek. Bij langere belichting zorgen verdamping en de grote intensiteit ervoor dat allylamine niet meer zo sterk bindt.

Nadat deze experimenten uitgevoerd waren, bleek dat er toch nog altijd een redelijk grote fractie aan allylamine verdampt. Deze fractie tast de elektronica van de UV-lamp aan. Daarom wordt een nieuwe reactiekamer ontworpen (Figuur 25), die luchtdicht afgesloten kan worden. Deze bestaat wederom uit een teflon reservoir, dat afgesloten kan worden met een metalen deksel waarin een kwartsraam is geplaatst. Het kwartsglas van type JGS-1 heeft een UV-doorlaatbaarheid van 90 % bij 254 nm en is afkomstig van glasatelier Saillart in Meerhout, België. Het metalen deksel kan door een schroefbeweging vastgezet worden op het teflon reservoir. Jammer genoeg is het kwartsglas voor deze opstelling door problemen bij de leverancier niet aangekomen voor het einde van deze thesis. Metingen met deze opstelling kunnen in de toekomst nog uitgetest worden.

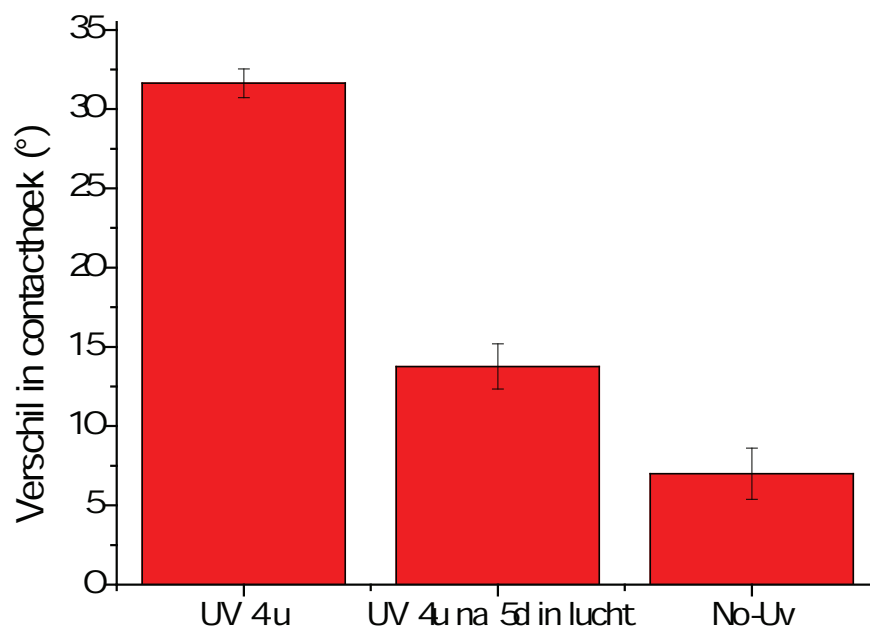


Figuur 25: De luchtdichte opstelling, bestaande uit een metalen deksel met kwartsraam en teflon reservoir met schroefdraad

Vervolgens wordt de stabiliteit van de allylaminelaag op het NCD-oppervlak getest in functie van de tijd. De stalen worden in het labo bewaard in petrischaaltjes aan omgevingstemperatuur in de laboratorium omgeving. Er wordt vergeleken wat het verschil in contacthoek bedraagt na 5 dagen.

Tabel 8: Vergelijking tussen stalen die 4 u met UV belicht werden en dezelfde stalen na 5 dagen in de laboratoriumomgeving

UV 4 u	31,63	0,9	84,16917	52,53694
UV 4u na 5d in lucht	13,76	1,42611	84,16918	70,40528
No-Uv	6,99	1,61583	89,49278	82,50167



Figuur 26: vergelijking tussen het verschil in contacthoek vlak na aanhechting en na 5 dagen in laboratoriumomgeving

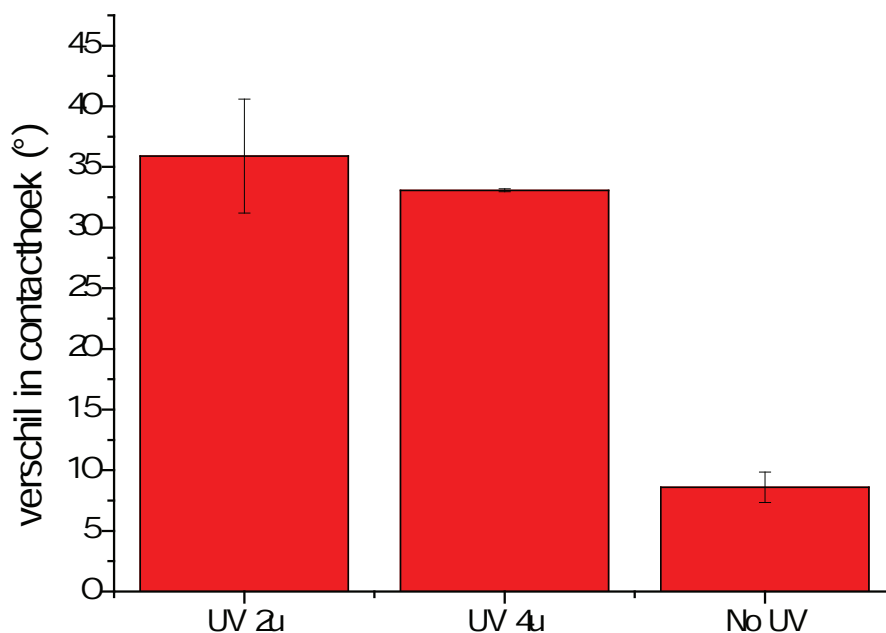
Na 5 dagen bedraagt het verschil in contacthoek nog minder als de helft van de waarde vlak na belichting. Verder blijft deze waarde nog maar net boven de minimale waarde voor het contacthoekverschil om significant te zijn voor binding met de allylgroep (10°). Dit betekent dat NCD-stalen die gefunctionaliseerd worden met allylamine, onmiddellijk na behandeling verder gebruikt moeten worden.

3.2.2 Functionalisatie met ethyleendiamine

Vanwege de moeilijkheidsgraad van werken met allylamine (aantasting van de UV-reactiekamer) en de wachtermijn voor de constructie van de reactiekamer wordt er verder gewerkt met ethyleendiamine. Er zijn geen voorgaande data beschikbaar over ethyleendiamine aanhechting aan diamant, maar de C-N binding die gevormd wordt door binding van de aminogroep van ethyleendiamine kost minder energie dan de C-C binding die gevormd wordt bij vorming van de dubbele binding allylamine aanhechting. In een eerste reeks experimenten worden gehydrogeneerde NCD-stalen voor 2 en 4 u belicht met UV na bedekking met ethyleendiamine.

Tabel 9: vergelijking tussen de UV-belichting van gehydrogeneerde NCD stalen bedekt met ethyleendiamine voor 2 u en 4 u

UV 2u	35,89	4,686783	84,97444	49,08333
UV 4u	33,07	0,115887	84,97444	51,90806
No UV	8,59	1,260608	84,19333	8,588333



Figuur 27: vergelijking tussen de UV-belichting van gehydrogeneerde NCD stalen bedekt met ethyleendiamine voor 2 u en 4 u

Op figuur 27 is duidelijk te zien dat er een contacthoekverschil van bijna 36° meetbaar is voor 2 u UV-belichting en een verschil van 33,07° voor 4 u belichting met UV. Dit zijn hogere waarden dan gemeten met allylamine. De aanhechting met ethyleendiamine blijkt dus efficiënter te verlopen. Zoals reeds gezegd in de inleiding is er bij ethyleendiamine geen competitie doordat het een symmetrisch molecule is en is bovendien de C-N binding stabielere dan de C-C binding gevormd bij allylamine. Dit zijn de meest waarschijnlijke oorzaken voor het hogere verschil in contacthoek.

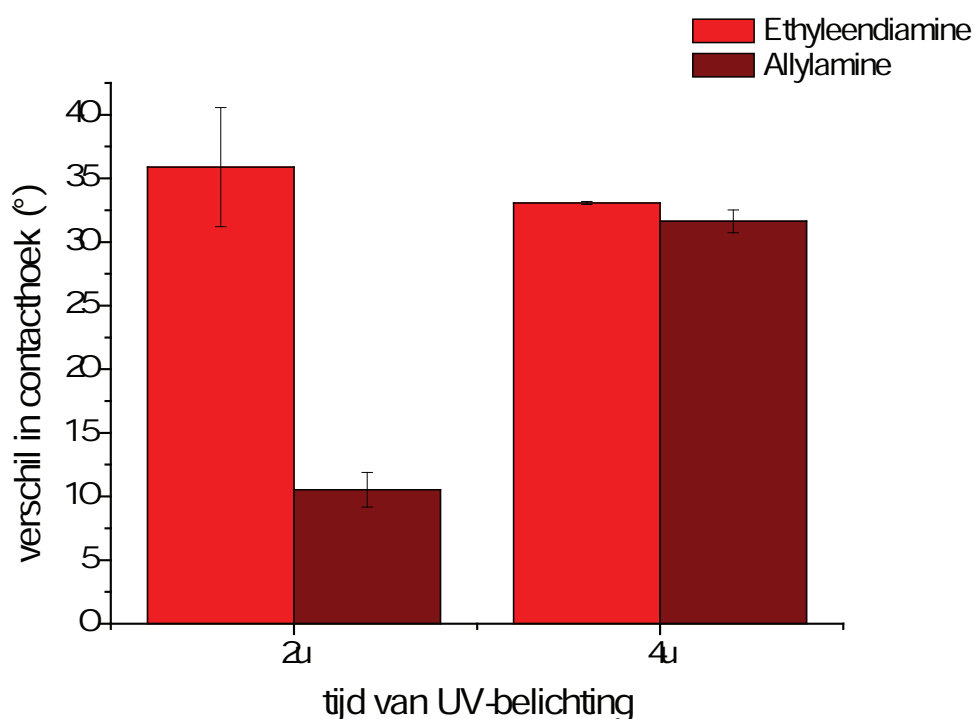
Bij 4 u belichting blijft de contacthoek wel stabielere. De standaarddeviatie is een stuk kleiner als bij 2 u belichting (0,11 tegenover 4,68). Na 2 u is de binding dus blijkbaar nog niet zo stabiel als na 4 u belichting met UV. Ook bij andere belichtingstijden werd de aanhechting getest, maar deze metingen werden uitgevoerd op een andere batch NCD-stalen. Deze stalen hadden geen constante contacthoek over het gehele oppervlak en er bleek ook dat de laagdikte varieerde over het oppervlak. De contacthoeken bleken ook veel te laag voor gehydrogeneerd NCD (50-65° in plaats van 82-95°). De resultaten van behandeling met ethyleendiamine op deze stalen conflicteren zowel onderling met elkaar als met eerdere resultaten met eerdere stalen. Deze resultaten zijn dan ook weggelaten wegens onbetrouwbaar.

Hierboven werd reeds aangehaald dat de verschillen in contacthoek groter zijn dan die van allylamine, dus worden de resultaten voor aanhechting met ethyleendiamine vergeleken met die van allylamine voor vergelijkbare tijden van belichting. In tabel 10 en figuur 25 is te zien dat de aanhechting voor een belichtingstijd van 2 u voor een veel groter contacthoekverschil zorgt bij

aanhechting met ethyleendiamine. Deze waarde is meer dan het driedubbele van de aanhechting met allylamine. Voor een belichting van 4 u blijkt allylamine voor een vergelijkbaar resultaat te zorgen. Om een nauwkeurige vergelijking tussen beide te maken zijn echter nog meer metingen voor aanhechting met ethyleendiamine nodig voor andere belichtingstijden.

Tabel 10: vergelijking van de contacthoek verschillen tussen ethyleendiamine- (EDA) en allylamine- (AA) functionalisatie van gehydrogeneerd NCD

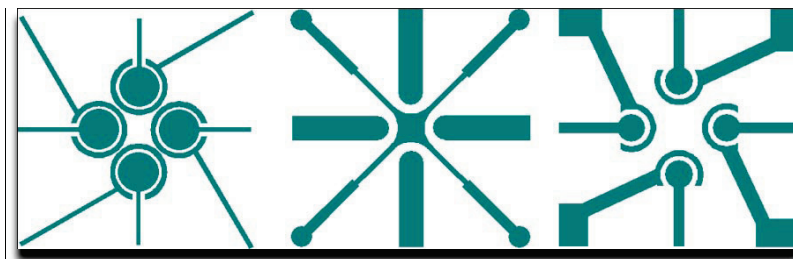
2u EDA	35,89	4,686783	84,97444	49,08333
2 u AA	10,53	1,36	82,33333	71,80333
4u EDA	33,07	0,115887	84,97444	51,90806
4u AA	31,63	0,9	84,16917	52,53694
6u AA	22,61	0,729873	88,98273	66,37273



Figuur 28: vergelijking van de contacthoek verschillen tussen ethyleendiamine- en allylaminefunctionalisatie van gehydrogeneerd NCD

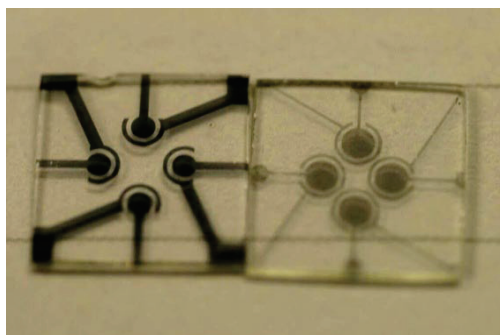
Uit de proeven die uitgevoerd werden op 10-UDA getermineerd NCD vallen weinig conclusies te trekken. Er viel geen fluorescentie op te meten, maar het is onduidelijk of dit komt doordat de ethyleendiamine niet bindt met de 10-UDA of doordat ze niet bindt met het gelabeld DNA. Verder onderzoek is hier nog nodig.

3.3 Design maskers



Figuur 29: het design van mogelijke sputtermaskers

In figuur 27 staan enkele van de mogelijke ontwerpen van elektrodes op de chip en in figuur 28 het resultaat. Zoals eerder aangehaald is het belangrijk dat er zich geen ladingsophopingen voordoen en het vermijden van 'hot spots' waardoor de stroom twee elektrodes kan overbruggen. Design werd uitgevoerd met het programma Clewin4 van Wieweb software (Nederland). Het design werd uitgevoerd op stalen van 1 x 1 cm. Absolute vereisten zijn vier aparte elektrodes en ofwel één gemeenschappelijke tegenelektrode of één per kanaal. Om ladingsophopingen te vermijden kan de negatieve elektrode best rondom de meetelektrode getekend worden. Met een HD-camera kan de waterstofgasvorming over het elektrode oppervlak opgevolgd worden. Deze spreidt zich uit over het gehele oppervlak, en er zijn dus niet direct ladingsophopingen waarneembaar.

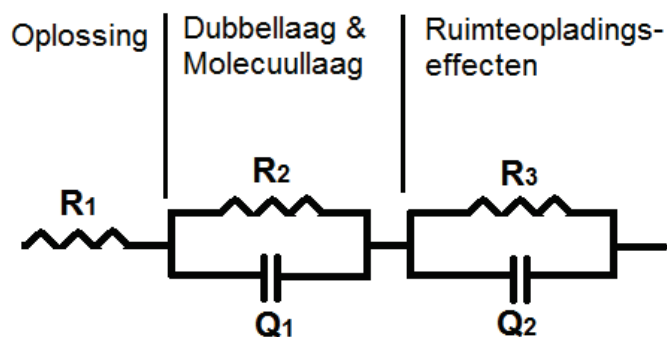


Figuur 30: de elektrodepatronen op een chip

3.4 Impedantiemetingen

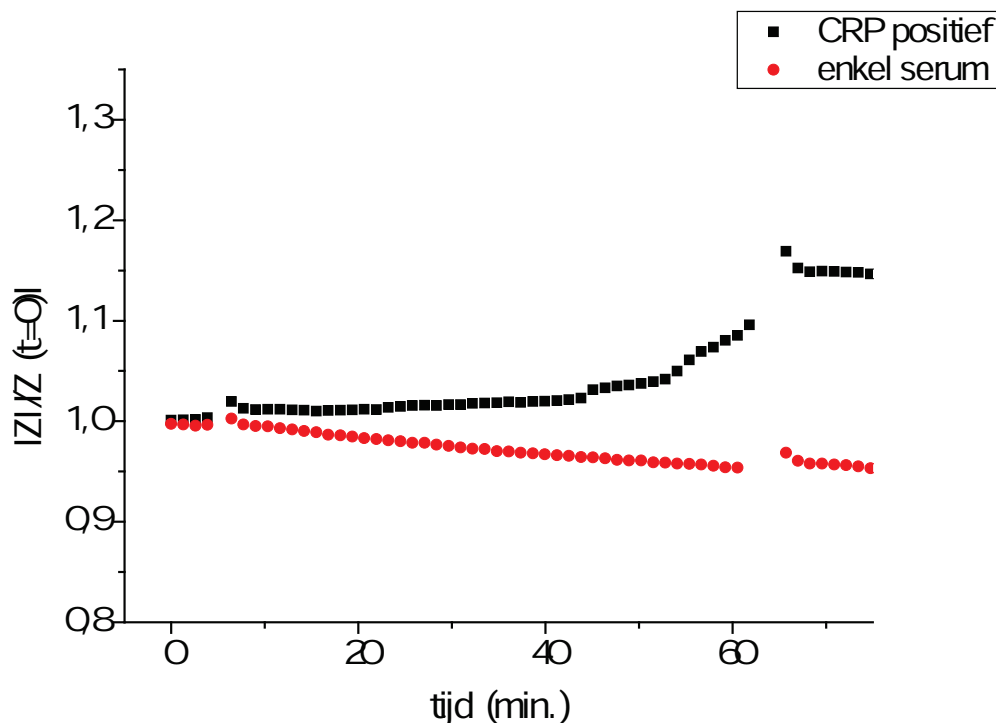
3.4.1 Top-down opstelling

Op de geminiaturiseerde opstellingen worden impedantiemetingen uitgevoerd om te testen of deze opstellingen bruikbaar zijn voor het onderzoek. Op de *top-down* opstelling waren al metingen van concentratiereeksen uitgevoerd in een eerder onderzoek. Het equivalent model (Figuur 31) is hier al bepaald en de concentratiegevoeligheid is al bevestigd. De fysische verklaring van elk deel van het equivalent schema staat aangeduid in figuur 31.



Figuur 31: een equivalent schema van de *top-down* opstelling met fysische verklaring van elk deel

De volgende stap is hier om een CRP-bindingsevent te volgen in *real-time* in serum zoals beschreven in 0. De metingen worden uitgevoerd op gehydrogeneerd diamant in een temperatuur- en vochtgecontroleerde omgeving (oven) op 37° C. De *wells* van de sensor werden eerst gevuld met serum. 500 nM CRP wordt toegevoegd als het impedantiesignaal stabiel is in de *well* van kanaal 1. Daarna wordt de impedantie gevolgd in de tijd. Als de grootte van de impedantie genormaliseerd wordt ten opzichte van de impedantie vlak voor toevoegen van de CRP bij tijd 0, wordt de curve in figuur 32 bekomen.



Figuur 32: de modulus, genormaliseerd ten opzichte van de modulus bij CRP toevoeging (111 min. : t = 0) in functie van de tijd bij het bindingsevent bij 100 Hz. Na 111 min. wordt CRP toegevoegd in kanaal1. Kanaal 2 bevat serum.

Op de curve van de genormaliseerde modulus is de reactie van het impedantiesignaal op het bindingsevent duidelijk te volgen. Er valt duidelijk te zien dat na toevoegen van CRP in kanaal 1 een

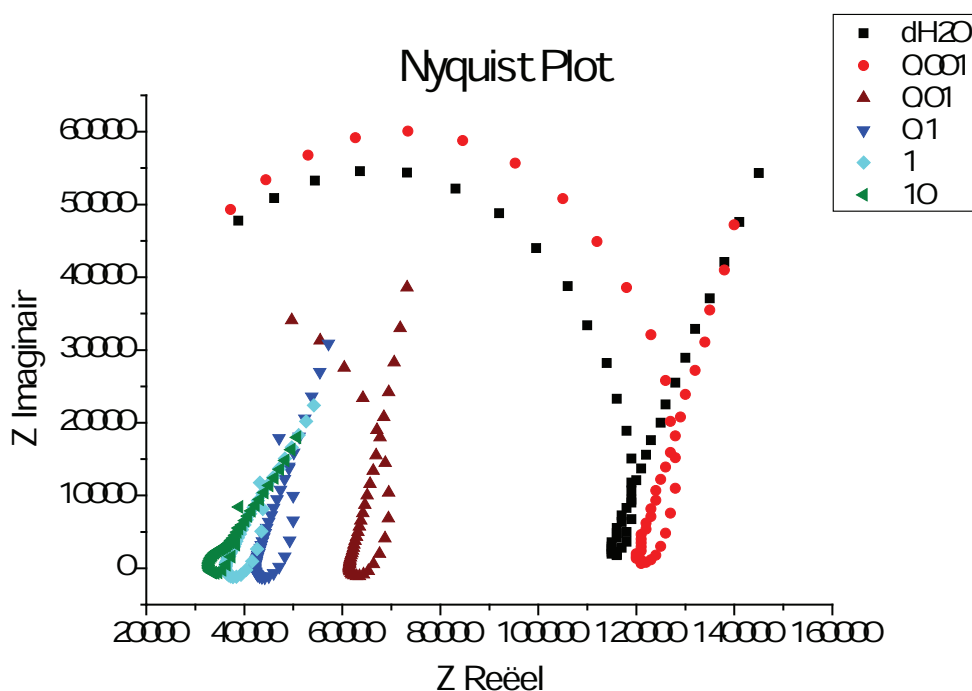
stijging in de impedantie plaatsvindt van ongeveer 15 %. Op de curve van het kanaal met enkel serum valt geen stijging op te merken.

3.4.2 Coplanaire opstelling

Voor de coplanaire opstelling moet eerst bewezen worden, dat de opstelling verschillende concentraties kan onderscheiden. Ook moet er nog een equivalent elektrisch schema opgesteld worden.

Eerst wordt er een concentratiereeks van PBS opgenomen op gehydrogeneerd NCD. Dit heeft meerdere doelen: er kan onder andere gecontroleerd worden of de sensor reageert op veranderingen in concentratie. De impedantieresultaten leveren de Nyquist en Bode plots voor een systeem met enkel buffer, de basisplots waarmee alle andere curven vergeleken kunnen worden. Bovendien kan uit de Nyquist plots een equivalent schema afgeleid worden.

De concentratiereeks begint bij het meten van zuiver gedemineraliseerd water en loopt van 0,001x PBS tot 10x PBS in tienvoudige stappen.



Figuur 33: Nyquist plot van een meting over de coplanaire sensor met gehydrogeneerd NCD van een concentratiereeks van PBS (0,001x; 0,01x; 0,1x; 1x; 10x)

De Nyquist plot (Figuur 33) bestaat uit een halve cirkel, een lus en het begin van een tweede halve cirkel. De eerste halve cirkel wordt kleiner met stijgende concentratie. Dit wijst op de weerstand van de oplossing. Als de concentratie aan buffer stijgt, stijgt de concentratie aan ionen in de oplossing en

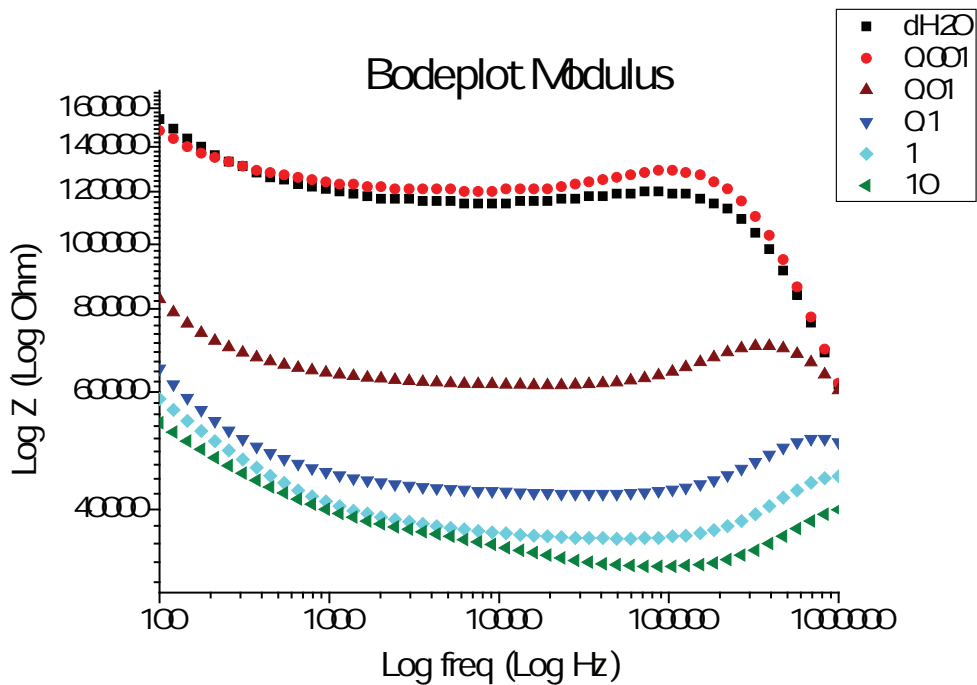
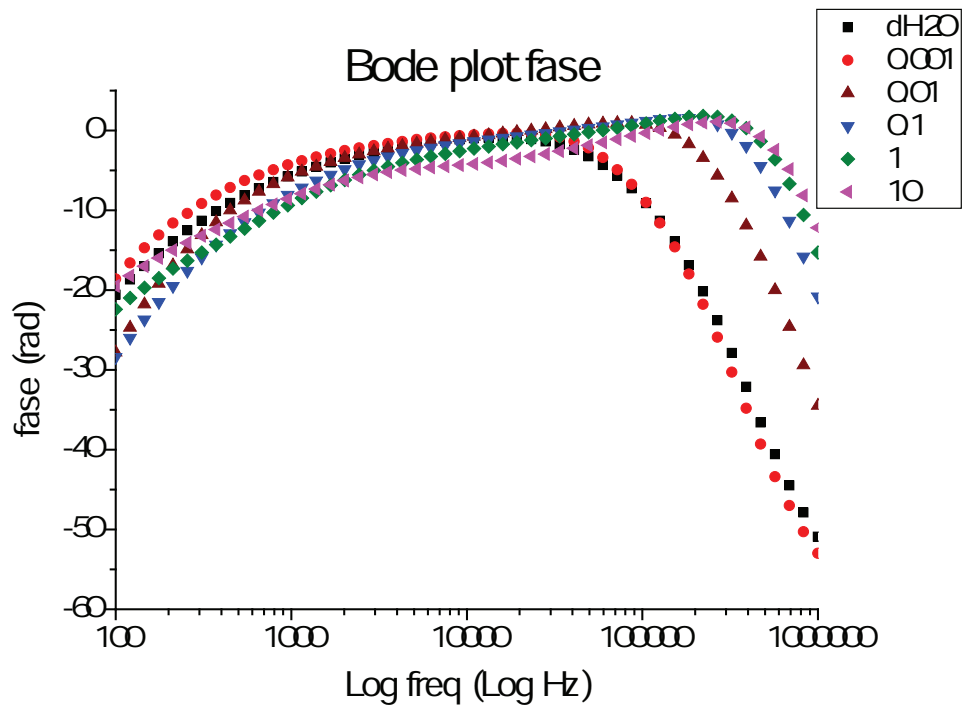
daalt de weerstand. De proporties van de cirkel staan dus in verband met de weerstand van de oplossing boven de sensor.

De tweede halve cirkel verandert in deze meting niet van grootte. Deze is mogelijk een indicatie voor een vaste weerstand van de sensoropstelling. Deze weerstand zal vermoedelijk te wijten zijn aan de weerstand van de dubbellaag. Uit de hoek die de tweede halve cirkel maakt kan afgeleid worden dat deze weerstand veel groter is als de weerstand van de oplossing. Uit de overgang tussen de twee cirkels en het begin van de lus kan bovendien afgeleid worden dat deze tweede cirkel gekoppeld is aan een capaciteit. Deze is ook afkomstig van de dubbellaag aan het elektrodeoppervlak.

De lus wijst op een kleine inductie in het circuit. Vermoedelijk is deze afkomstig van de bekabeling, maar dit valt bijna niet te controleren of weg te werken. Het inductief effect is ten eerste zeer klein, het valt niet meer verder te reduceren. Ten tweede is het een intrinsiek deel van de opstelling, en dus moeilijk te isoleren.

Mogelijke elementen van een equivalent circuit zijn dus een weerstand van de oplossing, een tweede weerstand van de diamantelektrode, en een klein inductief effect door de bekabeling. Om het equivalent schema op te stellen zijn echter nog meer proeven nodig en het fitten van de curve met software zoals ZSimpwin om de individuele waarden van elk onderdeel van het schema te bepalen en om de bruikbaarheid van het schema in verschillende situaties te toetsen. Een meer diepgaande beschrijving van het equivalent schema van deze opstelling valt echter buiten het tijdsbestek van deze thesis.

Er wordt geprobeerd om de inductie weg te kalibreren door het gebruik van een andere kalibratiemethode. Een kortgesloten chip werd gebruikt in plaats van een tindraad in een poging om de inductie te reduceren. Maar zelfs met deze methode bleek de inductie niet volledig te vermijden.

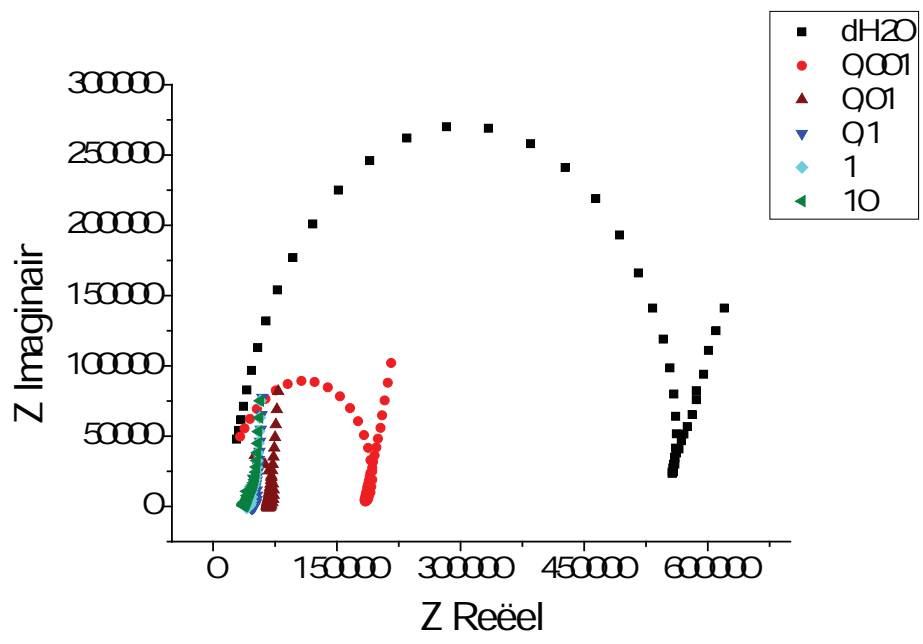


Figuur 34: Bode plots van de fase en modulus voor een meting op de coplanaire sensor met een concentratiereeks van PBS (0,001x; 0,01x; 0,1x; 1x; 10x)

Ook uit de Bodeplots kan redelijk wat informatie opgenomen worden (Figuur 34): de fase blijft constant rond de 0° voor het gebied tussen 1000 Hz en 50 kHz en ook de modulus is relatief constant in dit gebied. Dit betekent dat voor het gebied tussen 1000 Hz en 50 kHz de impedantie voornamelijk resisatief is. Op de curven valt op dat voor hogere concentraties, de impedantie ook voor hogere

frequenties resistief blijft. Bij een bufferconcentratie van 10x PBS blijft de fase zelfs tot 0,5 MHz rond de 0°. Bij lage frequenties is de impedantie wel overwegend capacitef.

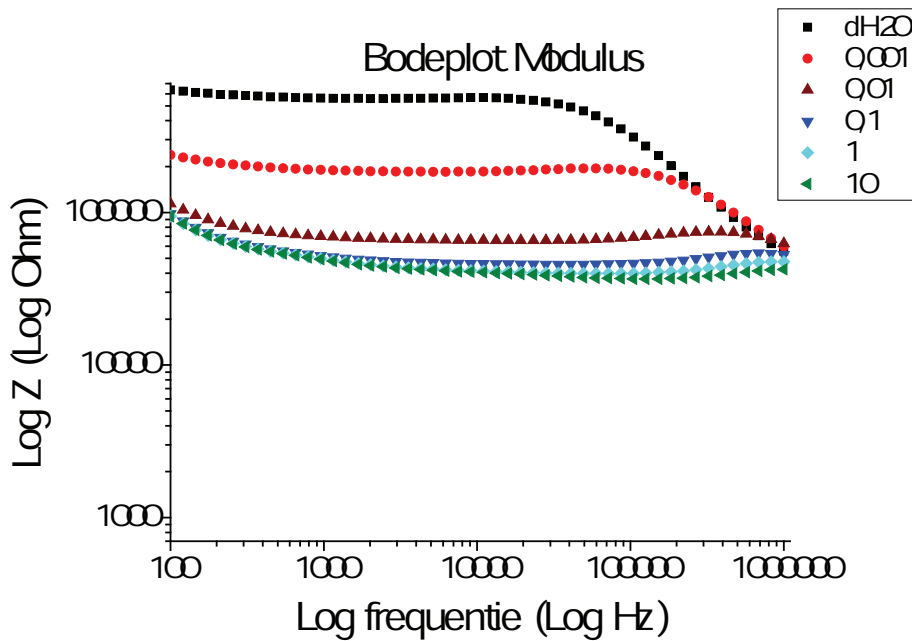
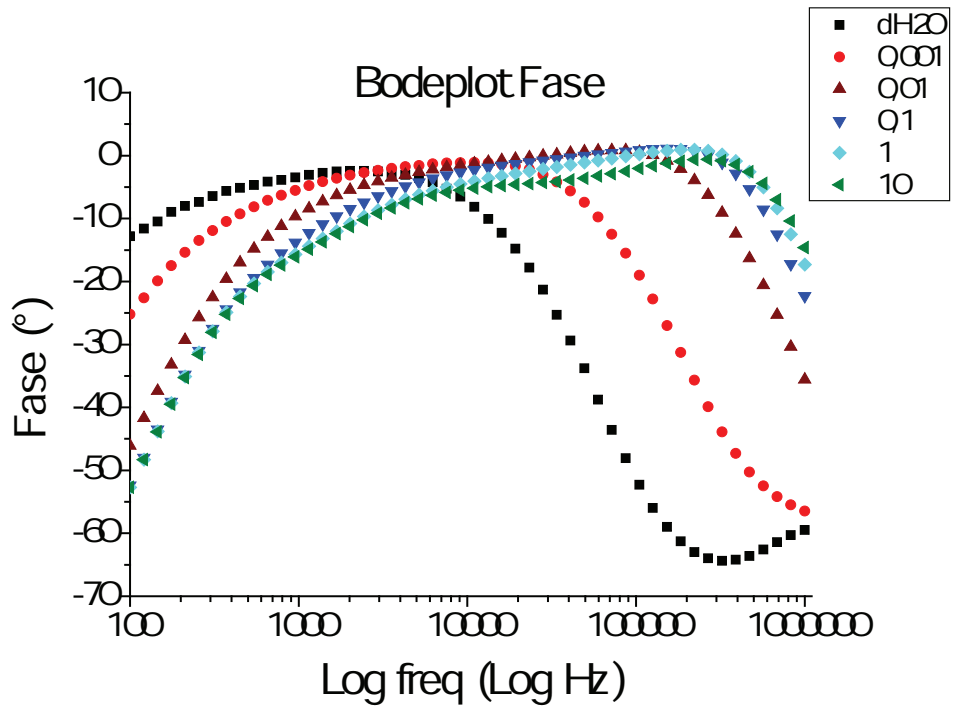
In een volgend experiment worden er aluminium contacten bovenop Ti contacten op het gehydrogeneerde NCD-staal gesputterd. Dit is dus een test op een chip met elektrodes van gehydrogeneerd diamant met aluminium contacten. Hiermee kan getest worden hoe de opstelling reageert op een bewerkte chip, zoals die mogelijk gebruikt kan worden in een echte meting. Dit levert volgende Nyquist plot (Figuur 35). Voor de rest is deze meting gelijk aan de vorige.



Figuur 35: Nyquist van een impedantiemeting van een concentratiereeks van PBS over een gepatroneerde gehydrogeneerde NCD-chip met aluminium contacten erop gesputterd

In deze curve is een verschil te zien met de Nyquist van een plaatje dat enkel met NCD bedekt is. Wanneer deze curve vergeleken wordt met figuur 33 valt onmiddellijk op dat het inductief effect veel minder uitgesproken is, vooral bij lage concentraties. Ook kan men de oplossingsweerstand beter schatten, doordat er meer zichtbaar is van de eerste halve cirkel in de curve.

Op de Bodeplots (Figuur 36) valt een heel ander gedrag op dan bij een NCD-staal waarop geen contacten gesputterd zijn. De impedantie is al bij lage frequenties vooral resistief.



Figuur 36: Bodeplots van een impedantiemeting van een concentratiereeks van PBS op een gehydrogeneerde gepatroneerde NCD-chip waarop aluminium contacten gesputterd zijn

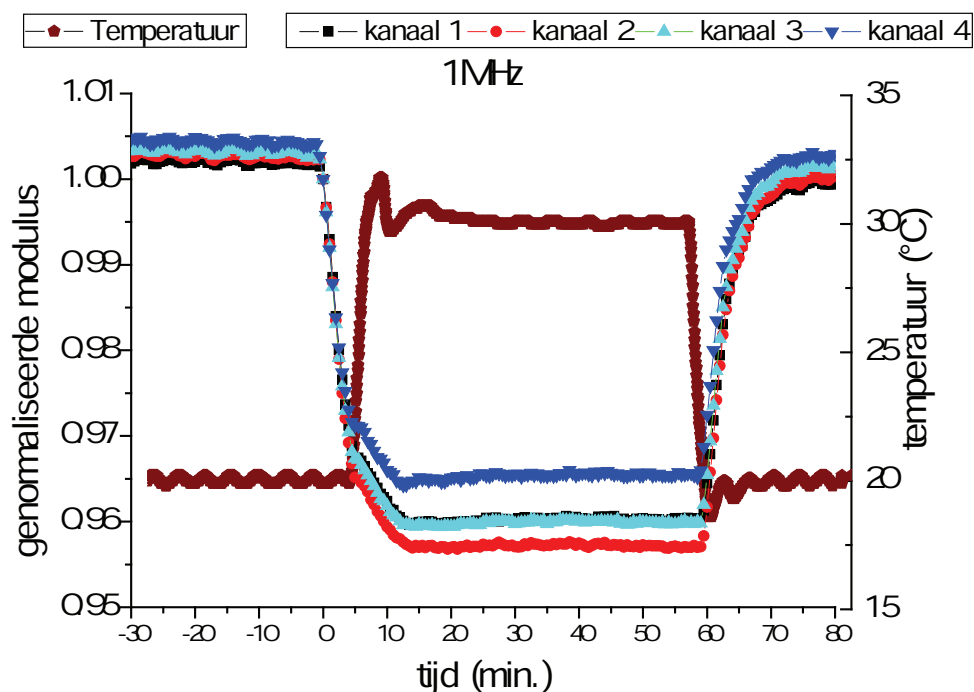
In een volgende test werd de invloed van de biasspanning en de oscillatiespanning beproefd. De biasspanning werd gevarieerd van -2 V tot 2 V in stappen van 0,5 V en de oscillatiespanning werd gevarieerd van 1 tot 100 mV in stappen van 25 mV, maar in beide gevallen blijkt dat er weinig tot geen invloed wordt opgemeten van deze twee variabelen. De data is hier verder niet vermeld.

Bij een volgende proef wordt de temperatuursafhankelijkheid van de coplanaire sensor bepaald. De opstelling wordt in een oven geplaatst en een temperatuurprogramma wordt ingegeven voor de oven. Het gebruikte temperatuurprogramma staat in onderstaande tabel (Tabel 11).

Tabel 11: Temperatuurverloop

30 min.	20 °C
5 min.	2°/min overgang
60 min.	30°C
5 min.	2°/min overgang
30 min.	20°C

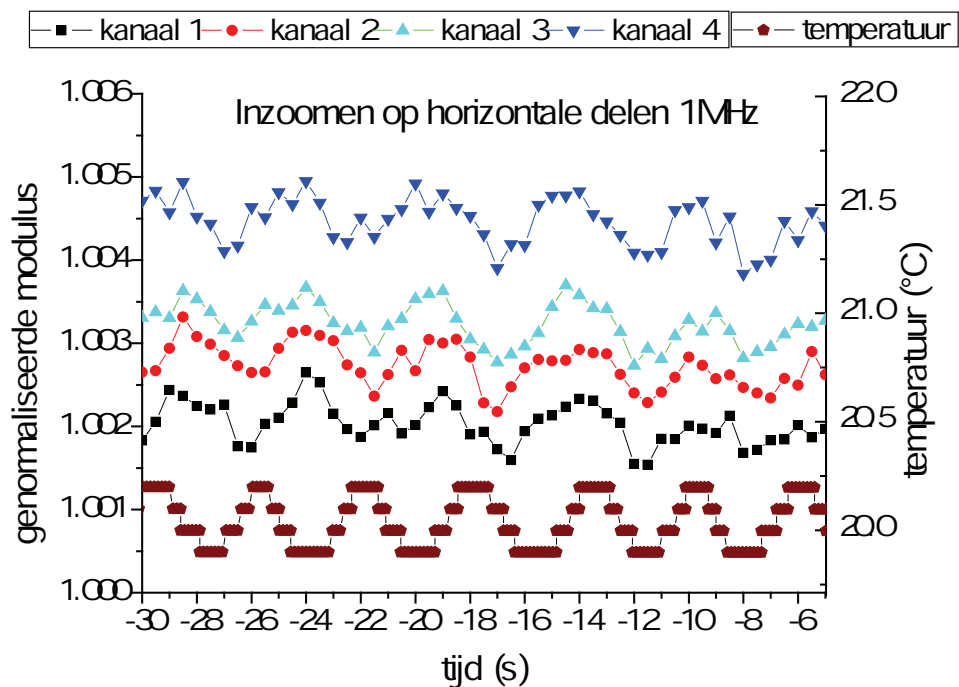
De reactie van het impedantiesignaal van de sensor met gehydrogeneerd NCD op deze temperatuurveranderingen wordt weergegeven in onderstaande curven (Figuur 37).



Figuur 37: de genormaliseerde modulus bij 1 MHz ten opzichte van de temperatuurveranderingen

De temperatuur heeft duidelijk een invers effect op de modulus. Bij stijgende temperatuur daalt onmiddellijk de impedantie. Een stijging in temperatuur van 10 °C heeft een daling van 4 % in modulus tot gevolg. Dit is dus een dalingsgraad van 0,4 %/°C. Wanneer de temperatuur constant blijft, is er een duidelijk golfpatroon waarneembaar in de curven (Figuur 38). Dit is afkomstig van de temperatuurregelaar, dit is een PID-regelaar, zodat de temperatuur telkens juist de gewenste temperatuur voorbijschiet. Dit patroon was te verwachten, aangezien diamant een halfgeleider is en de impedantie van halfgeleiders daalt bij stijgende temperatuur.

Dit is duidelijk waar te nemen in figuur 38. De kanalen 1 tot 4 volgen allemaal hetzelfde herhalende patroon, dat het omgekeerde patroon is van de temperatuurregeling.



Figuur 38: inzoomen op een stuk van de curve van de modulus in functie van de tijd op een plaats in de curve waar de temperatuur constant gehouden wordt. De tijd is negatief omdat deze aftelt naar de temperatuurverandering (deze ligt 5 s verder op de curve)

4 Discussie en conclusies

4.1 Fluorescentiemetingen van adsorptie

Een duidelijk resultaat van de metingen van de fluorescentie intensiteit is de bevestiging van de bevindingen van Nebel et al. (9). Geoxideerd NCD vertoont betere adsorptie-eigenschappen voor antilichamen dan gehydrogeneerd NCD. Dit werd aangetoond met een standaard ELISA-protocol waarbij geoxideerd NCD ongeveer een dubbel zo grote fluorescentie intensiteit aangaf als gehydrogeneerd NCD en met een rechtstreekse adsorptie.

De basisintensiteit van de Ab op geoxideerd NCD werd opgemeten en vergeleken met een blanco staal. Met bleking werd bevestigd dat het daadwerkelijk om adsorptie gaat. Deze adsorptie werkt het beste bij aanhechtingstijden vanaf 30 min. Deze data kan in een verder stadium van het onderzoek als referentie gebruikt worden en is ook al in gebruik bij het onderzoek van de fysisorptie gebaseerde sensor beschreven door Bijmens et al. (4). Zij werkten hiervoor met gehydrogeneerd NCD. Ook een herkenning van Ab door Ab-X werd uitgevoerd op het geoxideerd NCD-oppervlak. Hier verzamelt de intensiteit zich vooral in kleine clusters. Het is moeilijk te zeggen of de intensiteit afkomstig is van een herkenning van NCD-gebonden Ab door Ab-X.

4.2 NH₂-functionalisatie

Contacthoekmetingen tonen aan dat allylamine aan kan hechten aan gehydrogeneerd NCD. Het hecht bovendien aan met het allyluiteinde, wat gewenst is om een aminogetermineerd NCD-oppervlak te bekomen.

Bij het opmeten van een reeks met verschillende belichtingstijden met UV blijken belichtingstijden vanaf 4 uur het beste resultaat te leveren, namelijk 31,63° daling in contacthoek na aanhechting. Bij belichtingstijden langer dan 4 uur moet wel rekening gehouden worden met verdamping van het allylamine, en mogelijke vernietiging van enkele bindingen door de langdurige blootstelling aan hoge intensiteit UV. Daarom werd een reactiekamer uit teflon ontwikkeld die afgesloten kan worden en dus minder last van verdamping zal hebben. Deze kamer moet nog worden uitgetest. Ook grotere afstanden tussen UV-lamp en stalen kunnen getest worden om de invloed van de intensiteit te evalueren.

Uiteindelijk werden twee verschillende opstellingen gebruikt: één waarbij het staal onder een kwartsglaasje werd geplaatst en een teflon reservoir waar een kwartsglaasje bovenop geplaatst kan worden. De tweede opstelling vertoont betere resultaten, waarschijnlijk doordat verdamping bij deze opstelling vermindert.

Bij houdbaarheidsmetingen blijkt dat stalen bedekt met allylamine slechts beperkt houdbaar zijn. Na 5 dagen bleek het contacthoekverschil met de originele staat van het oppervlak gehalveerd. Na NH₂-functionalisatie dienen de stalen dus direct verder gefunctionaliseerd te worden en gebruikt te worden.

Bij het onderzoek van Zhuang et al. (15) werd een optimale belichtingstijd van 24 uur voorgesteld. Bij zijn onderzoek wordt het diamant wel gecontamineerd met fluor, wat niet ideaal is voor biologische toepassingen. Zhuang heeft hiervoor ToF-SIMS gebruikt en meldt dat de aanhechting stijgt tot een maximum bij 24 uur en dan weer daalt. Zhou et al. (16) stellen dat 12 uur belichting ideaal is voor allylamine aanhechting, maar ook hier wordt een beschermende groep gebruikt, en wordt slechts een gedeeltelijke bedekking van het oppervlak bekomen. Zhou et al. meten wel vergelijkbare contacthoekverschillen (82° voor, 48-61° na).

Ook in de resultaten van dit onderzoek werd vastgesteld dat een stijgende belichtingstijd tot een betere aanhechting leidde. Maar met gebruik van de opstelling die zowel Zhuang als Zhou voorstelde blijkt dat na 4 uur belichting een groot deel van de allylamine verdampt en er dus geen betere resultaten bekomen worden.

Ethyleendiamine is de tweede linkermolecule die getest werd. In een eerste vergelijking met allylamine blijkt ethyleendiamine beter te scoren: het contacthoekverschil is zelfs bij kortere belichtingstijden boven de 20° (35,89°) en bedraagt bij 4 u belichtingstijd 33,07° (cfr. Allylamine 31,63°). Meer metingen zijn wel nodig om dit resultaat te bevestigen. Er werden immers enkel aanhechtingen bij belichtingstijden van 2 en 4 uur uitgevoerd. Wat wel kan bevestigd worden, is dat ethyleendiamine minder snel verdampt als allylamine, en dus minder last heeft van verwarming van de samples gedurende langere belichtingstijden, en ook minder de elektronica van de reactiekamer van de UV-lamp aantast.

Er is dus bevestigd dat zowel allylamine als ethyleendiamine zonder beschermende groep kan binden aan gehydrogeneerd NCD via UV-belichting. In verdere testen kan de nieuwe opstelling in gebruik genomen worden, kan de hoogte van de UV-lamp aangepast worden om de intensiteit te variëren, en kan de aanhechting van biomoleculen aan het NH₂-gefunctionaliseerd NCD onderzocht worden.

4.3 Impedantiemetingen

Voor de *top-down* opstelling is de belangrijkste vaststelling dat CRP-herkenning mogelijk is bij de geoptimaliseerde opstelling in serum. Deze werd uitgevoerd op gehydrogeneerd NCD. Bij toevoegen van CRP aan het serum werd een impedantiestijging van ongeveer 15 % vastgesteld. Door binding van de CRP met de anti-CRP op het oppervlak verdikt immers de biologische laag op het NCD-

oppervlak, waardoor de diëlektrische eigenschappen van deze laag veranderen en de capaciteit van deze laag daalt.

Op de coplanaire opstelling werd eerst een concentratie reeks van PBS buffer opgemeten. Hieruit kunnen de eerste elementen van een mogelijk equivalent schema gehaald worden. Een oplossingsweerstand, een dubbellaagweerstand en –capaciteit en een inductantie die waarschijnlijk afkomstig is van de bekabeling zijn waarneembaar. De opstelling is duidelijk concentratiegevoelig en blijkt een kleinere signaal-ruis verhouding te bezitten als de *top-down* opstelling, waarschijnlijk door de aanwezigheid van vier elektroden voor één well.

Uit het temperatuurprofiel blijkt dat de sensor temperatuurgevoelig is, en dat de temperatuur een inverse invloed heeft op de modulus van de impedantie. Deze metingen werden op een gehydrogeneerd NCD-staal uitgevoerd. Een stijging in temperatuur van 10 °C heeft een daling van 4 % in de genormaliseerde modulus tot gevolg. Dit is dus een dalingsgraad van 0,4 %/°C.

Een volgende stap in dit onderzoek zou de zoektocht naar een geschikt equivalent model zijn voor de coplanaire sensor. Verder dient een CRP-herkenning nog uitgevoerd te worden voor de coplanaire sensor om de werking te bevestigen. Tenslotte kunnen metingen met NH₂-gefunctionaliseerde NCD-chips uitgevoerd worden om te vergelijken met niet gefunctionaliseerd NCD.

Bibliografie

1. Meyer MH, Hartmann M, Keusgen M. SPR-based immunosensor for the CRP detection--A new method to detect a well known protein. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006 Apr 15;21(10):1987-1990.
2. Aizawa H, Kurosawa S, Ogawa K, Yoshimoto M, Miyake J, Tanaka H. Conventional diagnosis of C-reactive protein in serum using latex piezoelectric immunoassay. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2001 Jun 1;76(1-3):173-176.
3. McBride JD, Cooper MA. A high sensitivity assay for the inflammatory marker C-Reactive protein employing acoustic biosensing. *J Nanobiotechnology*. 6:5-5.
4. Bijnens N, Vermeeren V, Daenen M, Grieten L, Haenen K, Wenmackers S, e.a. Synthetic diamond films as a platform material for label-free protein sensors. *physica status solidi (a)*. 2009;206(3):520-526.
5. Mazer SP, Rabbani LE. Evidence for C-Reactive Protein's Role in (CRP) Vascular Disease: Atherothrombosis, Immuno-Regulation and CRP. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2004 Apr 1;17(2):95-105.
6. Bassuk SS, Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: Clinical importance. *Current Problems in Cardiology*. 2004 Aug;29(8):439-493.
7. Dominici R, Luraschi P, Franzini C. Measurement of C-reactive protein: Two high sensitivity methods compared. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2004;18(5):280-284.
8. Ramadan MAM, Shrive AK, Holden D, Myles DAA, Volanakis JE, DeLucas LJ, e.a. The three-dimensional structure of calcium-depleted human C-reactive protein from perfectly twinned crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002 5;58(6):992-1001.
9. Nebel CE, Zeisel R, Stutzmann M. Space charge spectroscopy of diamond. *Diamond and Related Materials*. Maart;10(3-7):639-644.
10. Szunerits S, Jama C, Coffinier Y, Marcus B, Delabouglise D, Boukherroub R. Direct amination of hydrogen-terminated boron doped diamond surfaces. *Electrochemistry Communications*. 2006 Jul;8(7):1185-1190.
11. May PW, Stone JC, Ashfold MNR, Hallam KR, Wang WN, Fox NA. The effect of diamond surface termination species upon field emission properties. *Diamond and Related Materials*. 1998 Feb;7(2-5):671-676.
12. Strother T, Knickerbocker T, Russell, Butler JE, Smith LM, Hamers RJ. Photochemical Functionalization of Diamond Films. *Langmuir*. 2002 Feb 1;18(4):968-971.
13. Yang N, Yu J, Uetsuka H, Nebel CE. Characterization of diamond surface terminations using electrochemical grafting with diazonium salts. *Electrochemistry Communications*. 2009 Nov;11(11):2237-2240.
14. Taylor I, Howard A. Measurement of primary amine groups on surface-modified silica and their role in metal binding. *Analytica Chimica Acta*. 1993 Jan 8;271(1):77-82.
15. Zhuang H, Srikanth VVSS, Jiang X, Luo J, Ihmels H, Aronov I, e.a. Allylamine-mediated DNA

- attachment to polycrystalline diamond surface. *Appl. Phys. Lett.* 2009;95(14):143703.
16. Zhou Y, Tian R, Zhi J. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*. 2007 Jan 15;22(6):822-828.
 17. Bex J, Grieten L, Wagner P, Michiels L. Constructie van een NCD-gebaseerde biosensor. 2009;
 18. Christiaens P, Vermeeren V, Wenmackers S, Daenen M, Haenen K, Nesládek M, e.a. EDC-mediated DNA attachment to nanocrystalline CVD diamond films. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006 Aug 15;22(2):170-177.
 19. Dynabeads MyOne Carboxylic Acid -invitrogen bead separations [Internet]. [geciteerd 2010 Jun 8];Available from: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/650%2011_12\(rev006\).pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/650%2011_12(rev006).pdf)
 20. Dataphysics products. DataPhysics Products OCA 15+ - contact angle meter [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: http://www.dataphysics.de/english/produkte_oca-15+.htm
 21. EIS_Primer_2007.pdf [Internet]. [geciteerd 2010 Mei 27];Available from: http://www.gamry.com/App_Notes/EIS_Primer/EIS_Primer_2007.pdf
 22. Vermeeren V, Grieten L, Wenmackers S, Daenen M, Haenen K, Wagner P, e.a. Impedimetric detection of C-reactive protein with a diamond-based immunosensor. nog te publiceren. 2010 Jun;
 23. Barsoukov E, Macdonald JR. Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications. John Wiley and Sons; 2005.
 24. Zourob M, Elwary S, Turner A. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer; 2008.

Bijlage: Interpretatie van impedantieresultaten

De meest gebruikte methode voor de analyse van impedantieresultaten is het gebruik van een equivalent model. De gemeten opstelling wordt gesimuleerd door klassieke elektrische componenten te gebruiken: weerstanden, capaciteiten, inductanties... Het model wordt opgebouwd uit deze elementen door eerst enkele elementen toe te wijzen aan vermoedelijke processen in de opstelling, bijvoorbeeld een 'dubbellaag aan het oppervlak', en de elementen voor deze processen in serie of parallel in te bouwen in het equivalent schema tot een goede benadering van het juiste circuit wordt bekomen.

Als eenmaal een goede benadering van het circuit is bekomen, kunnen met een met *fitting software* waarden bekomen voor de parameters van elk individueel element in het equivalent circuit om het circuit overeen te laten komen met de experimentele data.

De data worden meestal voorgesteld in Nyquist en Bode plots. Bode plots stellen de grootte en fase van de impedantie voor in functie van de frequentie. Deze geven op een duidelijke manier de afhankelijkheid van de frequentie van het systeem weer. Nyquist plots geven eerder informatie over de afzonderlijke elementen van de opstelling door de vorm van de curve. In een Nyquist plot geeft de imaginaire impedantie de capaciteit en inductantie weer in functie van de reële impedantie. Op deze plots is geen frequentie informatie aanwezig.

De initiële waarden om in te geven bij fitting software kunnen geschat worden door het gedrag van de elementen in de opstelling te onderzoeken in de Nyquist en Bodeplots. De waarden worden geschat door gebieden in de curven te zoeken waar de impedantie bijna volledig door één component wordt bepaald en daar een benadering te zoeken voor de parameters van deze component bij die frequentie.

De fasehoek is de hoek tussen de reële en imaginaire componenten van de impedantie bij een gegeven frequentie. Voor een ideale capaciteit is de fase -90° , bij een ideale weerstand is dit 0° . Bij een gecombineerd systeem van weerstanden en capaciteiten zal de fase tussen deze twee waarden liggen. Belangrijk om te onthouden in alle experimenten is dat de impedantie van een capaciteit laag is bij hoge frequenties en naar oneindig gaat bij lage frequenties, de fase zal bij lage frequenties dus meestal vooral capaciteef zijn en rond -90° liggen. Het gedrag van de fase en de grootte van de impedantie in functie van de impedantie geeft indicaties van de componenten die in de opstelling te vinden zijn (23,21).

De verschillende componenten kunnen herkend worden aan hun typische gedrag. De weerstand van de oplossing is bijvoorbeeld vooral afhankelijk van de vorm van de elektrode en de vorm van de meetcel. Ze wordt meestal geschat door de grootte van de impedantie bij hoge frequenties te bepalen en kan gecontroleerd worden door de conductiviteit van de gemeten oplossing te veranderen (vb. een bufferreeks). Ze wordt meestal beschouwd in serie te staan met de elektroden.

Een volgend element is de dubbellaag capaciteit die veroorzaakt wordt door de ophoping van ladingen aan de scheiding tussen de oplossing en het elektrode oppervlak. Deze ladingen worden gescheiden door het oppervlak, waardoor een capaciteit ontstaat. De waarde van deze capaciteit valt te halen uit de helling van een grafiek van $-1/Z$ ten opzichte van de frequentie. Omdat reële systemen nooit ideaal zijn wordt deze component soms vervangen door een constant fase element (CFE), waarbij de hoek bij lage frequenties niet exact aan -90° gelijk wordt verondersteld door dispersie

effecten van de capaciteit. Deze waarde is belangrijk in een sensor waarbij de staat van het oppervlak verandert, zoals bij de immunosensor in dit onderzoek.

Verder is er ook de ladingstransfer weerstand, die afkomstig is van ladingoverdracht tussen de oplossing en de elektrode. Deze is een indicator van redox processen aan het oppervlak van de meetelektrode. Deze weerstand is parallel aan de dubbellaag capaciteit. De waarde van deze weerstand kan bij kinetische controle geschat worden uit de diameter van de corresponderende halve cirkel op de Nyquist plot (24).

Door het typische gedrag van deze en mogelijke secundaire componenten in de Nyquist en Bode plots op te volgen kan men een equivalent model opstellen.

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Optimalisatie en miniaturisatie van een NCD-gebaseerde immunosensor

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

Jaar: **2010**

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

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

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

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

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

Voor akkoord,

Bex, Jan

Datum: **15/06/2010**