

Impedimetrische herkenning van tryptase met behulp van immunosensoren

Jan Alenus

promotor :
Prof. dr. Patrick WAGNER

co-promotor :
dr. F. Troost

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	1
Voorwoord	2
Samenvatting	3
1. Inleiding	4
1.1 Biosensor	4
1.2 Irritable Bowel Syndrome (IBS)	5
1.2.1 Verschijnselen van IBS	5
1.2.2 De oorzaak van IBS.....	6
1.2.3 Mestcellen en tryptase in IBS.....	8
1.3 De tryptase immunosensor	9
1.3.1 Analiet	9
1.3.2 De biologische herkenningslaag.....	11
1.3.3 De transducer laag.....	12
1.3.4 Sensor lay-out en data verwerking	13
1.4 Doel van de tryptase immunosensor	14
2. Materialen en Methoden	15
2.1 Sensor preparatie	15
2.1.1 Substraat preparatie	15
2.1.2 Elektroden	15
2.1.3 Transducer preparatie.....	18
2.1.4 Spincoating	18
2.1.5 Antilichaam incubatie	19
2.1.6 Wirebonding.....	19
2.2 Karakterisatie	20
2.2.1 Dektak	20
2.2.2 Contacthoekmetingen	20
2.2.3 Atomic Force Microscopy (AFM).....	21
2.3 Impedimetrische uitlezing	23
2.3.1 Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS).....	24
2.3.2 Elementen en hun eigenschappen.....	25
2.3.3 Data representatie	26
3 Resultaten en Discussie	30
3.1 Sensorpreparatie	30
3.1.1 Etsen van de elektroden.....	30
3.2 Karakterisatie metingen	33
3.2.1 Dektak	33
3.2.2 Contacthoekmetingen	34
3.2.3 Atomic Force Microscopy	37
3.2.4 Algemeen besluit	40

3.3 Impedimetrische uitlezing	40
3.3.1 Incubatiemeting	41
3.3.2 Coplaire TiN elektroden	42
3.3.3 Al interdigitale elektroden	48
3.3.4 Algemeen besluit	54
4 Conclusie	55
5 Referenties	56
6 Bijlage	59

Lijst met afkortingen

Ab: Antilichaam

AC: alternating current

AFM: atomic force microscopy

Al: aluminium

Ar: argon

Arg: arginine

Asn: asparagine

Au: goud

CRP: C-reactive proteïn

CZS: centraal zenuwstelsel

EIS: electrochemical impedance spectroscopy

ENS: enteric nervous system

IBS: irritable bowel syndrome

IDE: interdigitale elektroden

Lys: lysine

PBS: phosphate buffer solution

PDS: prikkelbaar darm syndroom

PPV: polyphenylene-vinylene

Pt: platina

Rpm: rounds per minute

Ti: titanium

TiN: titaannitride

Voorwoord

Graag had ik hier mijn dank geuit voor de mensen die deze stage mogelijk hebben gemaakt en mij een zeer leerzame en plezierige ervaring hebben bezorgd.

Ten eerste zou ik mijn begeleidster Evi Bongaers willen bedanken voor de begeleiding van dit project, voor de steun tijdens de stage en voor het aangenaam houden van het werk.

Ten tweede zou ik mijn dank willen uiten voor mijn Promotor Prof. Dr. Patrick Wagner die mij de kans heeft gegeven om te werken aan dit project en voor de uitstekende begeleiding gedurende de hele masteropleiding.

Ook dank aan mijn Co-promotor Dr. Freddy Troost die de mogelijkheid heeft gecreëerd om te werken aan dit project.

Een dankwoord gaat ook uit naar Dr. Luc Michiels die zo vriendelijk is om als tweede beoordelaar van deze master thesis te fungeren.

Niet te vergeten de steun en de vriendschappelijke omgang van de vele IMO collega's die van deze stage een onvergetelijke ervaring hebben gemaakt. In het bijzonder:

Ronald Thoelen en Peter Cooreman voor het altijd klaar staan om op mijn vele vragen te beantwoorden.

Michael Daenen, Vincent Mortet en Andrada Lazea voor het maken van de elektroden.

Ook een dankwoord aan Lars Grieten en Tine Boonen, mijn 2 master collega's op het IMO voor het creëren van een aangename werksfeer die mij alleen maar geholpen heeft tijdens de stage.

Mijn laatste dankwoord gaat uit naar mijn ouders die altijd in mij geloofd hebben en mij zo vrij hebben gelaten om mijn eigen weg te volgen.

Samenvatting

Patiënten met het '*Irritable Bowel Syndrome* IBS' krijgen door verhoogde fysische en psychische stress vrijzetting van *corticotropin releasing hormone* door de hypothalamus. Deze vrijzetting zal via de hersen – darm interactie zorgen voor activatie en destabilisatie van de mestcellen die zich in het slijmvlies van de dunne darm bevinden. De activatie en destabilisatie van de mestcellen zal zorgen voor de vrijzetting van tryptase en histamine in de dunne darm. Tryptase en histamine zullen, eenmaal vrijgezet, de slijmlaag in de darm beïnvloeden waardoor de motiliteit in de darm verandert, hierdoor kan er constipatie en/of diarree bij de patiënt ontstaan. Door middel van in vivo metingen in de darm, is het mogelijk een accuraat beeld te krijgen van de concentratie van de vrijgezette tryptase en histamine. Deze in vivo metingen kunnen gedaan worden met een immunosensor die specifiek tryptase of histamine bindt aan het antilichaam. De binding van tryptase aan het antilichaam wordt impedimetrisch uitgelezen. Er wordt gebruik gemaakt van coplanaire titaannitride elektroden of van aluminium interdigitale elektroden. De coplanaire titaannitride elektroden worden gemaakt via een etsprocedure of door sputtering. De aluminium interdigitale elektroden zijn verkregen via IMEC. Om de binding van tryptase aan de antilichamen naar een elektrisch signaal om te zetten, wordt er gebruik gemaakt van een OC₁C₁₀-PPV transducerlaag. De antilichamen worden voor één uur geïncubeerd op de transducerlaag. Tijdens dit uur zullen de antilichamen zich fysiek gaan adsorberen aan de oppervlakte. De fysieke adsorptie van de antilichamen wordt gecontroleerd met contacthoekmetingen en atomaire kracht microscopie. Uit deze resultaten blijkt dat de ideale antilichaam concentratie voor adsorptie, 100 pmol/ml bedraagt. Na toevoeging van 100 pmol/ml tryptase aan de immunosensor, is er bij de coplanaire titaannitride elektroden een netto impedantiedaling van 18 procent. Deze sensor wordt gefit met een RQ(RQ) equivalent circuit. Uit de waardes van deze fit, is er een duidelijke capaciteit verhoging aan de interface na toevoeging van tryptase, wat wijst op specifieke hechting van tryptase aan de antilichamen. Bij toevoeging van 100 pmol/ml tryptase aan de aluminium interdigitale elektroden is er een netto impedantiedaling van 12%. Uit de fits met equivalente circuits, is er een grotere capaciteit stijging van de interface. Dit komt omdat de interdigitale elektrodes minder in de solutie meten maar meer in de interface waar de antilichamen zitten en ook in de transducerlaag.

1. Inleiding

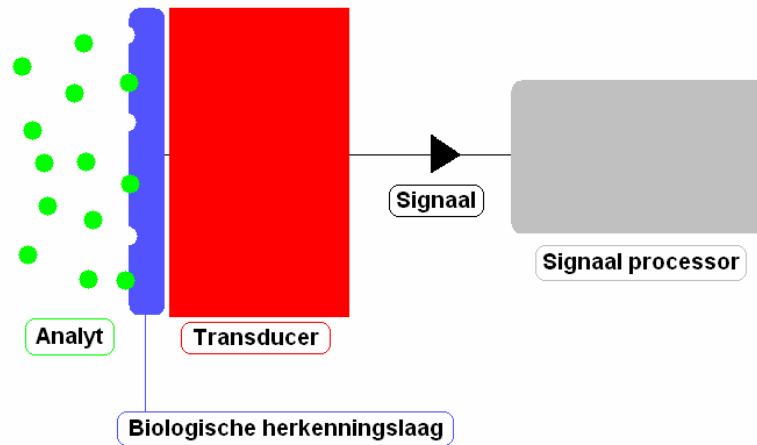
Met de leuze 'beter voorkomen dan genezen' hebben de biosensoren een belangrijke taak in de toekomst van de geneeskunde, de nadruk komt meer en meer te liggen op het vroegtijdig detecteren van bepaalde ziekte markers. Hierdoor kan snel opgetreden worden en kan de ziekte vermeden of vertraagd worden. C-reactive protein (CRP) is een merker voor hartschade, door een vroege opsporing op te sporen kan een hartinfarct vermeden worden. Dit kan verwezenlijkt worden door middel van immunosensors [1]. Buiten het vroegtijdig detecteren van ziektemarkers, kunnen biosensoren ook nog voor andere doeleinden gebruikt worden. Ze kunnen gebruikt worden om lage concentraties aan schadelijke stoffen te detecteren, zo is het dus mogelijk om deze stoffen te detecteren voordat hun concentratie hoog genoeg is om schade te berokkenen, bijvoorbeeld een biosensor die aan de hand van nitrificatie de toxiciteit van inkomend water bij een waterzuiveringstation kan bepalen [2]. Een ander doel is het bepalen van de hoeveelheid dat een bepaalde molecule aanwezig is in het lichaam, de bekendste van deze biosensoren is de glucose sensor die dus de hoeveelheid glucose in het bloed bepaalt.

1.1 Biosensor

Een sensor wordt volgens Dorland's medical dictionary beschreven als iets dat voelt; een apparaat dat specifiek ontworpen is om te reageren op een fysische stimulus (licht, hitte, druk, etc.) door het genereren van een impuls die gemeten of geïnterpreteerd kan worden [3].

Een biosensor wordt door the Physical Chemistry and Analytical Chemistry Divisions of IUPAC gedefinieerd als een zelf bevattend geïntegreerd toestel dat de mogelijkheid heeft om voor specifieke kwantitatieve of semi-kwantitatieve analytische informatie te zorgen, gebruikmakend van een biologisch herkenningselement dat in direct contact is met een transductie element [4].

De biosensor (Figuur 1) werkt dus volgens hetzelfde principe als een gewone sensor maar heeft één groot verschil, namelijk dat in elke biosensor een biologische component aanwezig is. Deze component is eigenlijk het deel van de sensor dat het analiet (de te detecteren component) zal detecteren. Deze biologische herkenningslaag kan bestaan uit verschillende componenten zoals enzymen, weefsel, bacteriën, gisten, antilichamen/antigenen, organellen en liposomen. Het grootste voordeel van een biologische component als herkenningslaag is dat hij zeer specifiek zijn analiet kan herkennen. Het grootste nadeel is dat deze biologische componenten niet geschikt zijn bij gebruik in extreme condities zoals temperatuur, pH en ionische kracht [5].



Figuur 1: Schematische lay-out van een biosensor.

De biologische herkenningslaag is verbonden met een transducer. De functie van de transducer is het omzetten van de geobserveerde verandering (fysisch of chemisch) naar een meetbaar signaal. Dit is meestal een elektrisch signaal waarbij de gemeten grootte van signaal proportioneel is aan de concentratie van het analiet [6]. Naargelang de natuur van de biochemische interactie met het analiet, kan de transducerlaag aangepast worden. De fysische transducers bestaan uit bv. elektrochemische, thermale, piezoelektrische en surface acoustic wave technology [5]. Het signaal dat van de transducer komt wordt dan met behulp van een signaal processor verwerkt. Het grote voordeel van deze set-up is dat er een combinatie is van de specificiteit en sensitiviteit van een biologisch systeem met de kracht van een microprocessor [6].

1.2 Irritable Bowel Syndrome (IBS)

Irritable bowel syndrome (IBS) of prikkelbare darm syndroom (PDS) is een veelvoorkomende gastro-intestinale aandoening die wordt gedefinieerd als een functionele darm aandoening waarbij abdominale pijn wordt geassocieerd met ontlasting of een verandering in darm gewoonten, met aanwijzingen van verstoorde ontlasting en zwelling van abdomen [7]. Ongeveer 20 % van de Amerikaanse bevolking heeft symptomen die overeenkomen met IBS [8], hiervan zijn 70 % van het vrouwelijk geslacht [9]. De prevalentie in Europa verschilt van land tot land bv. Frankrijk 20.0%, Nederland 9.0%, Zweden 12.5%, Denemarken 6.6% en Verenigd Koninkrijk 22.0% [10].

1.2.1 Verschijnselen van IBS

De belangrijkste verschijnselen van IBS zijn buikpijn en problemen met de stoelgang. Sommige patiënten hebben hier continu last van terwijl anderen voor lange periodes klachtenvrij kunnen zijn tot ze op een gegeven moment weer klachten krijgen. Deze klachten verschillen van patiënt tot patiënt en per patiënt kunnen deze klachten veranderen van tijd tot tijd.

Bij de meeste patiënten staat buikpijn op de voorgrond als voornaamste klacht. De buikpijn is meestal krampend van aard, met een golvend verloop, maar de buikpijn kan ook continu aanwezig zijn. Andere vormen van buikpijn die kunnen optreden zijn een stekende en brandende buikpijn. Pijn kan het meest gevoeld worden in de linkeronderbuik. Hier bevindt zich het sigmoïd, het nauwste gedeelte van de dikke darm. De pijn wordt veroorzaakt doordat spastische bewegingen de darm kunnen afsluiten. Na de stoelgang is er een pijnafname dit komt waarschijnlijk doordat bij het ledigen van de dikke darm de prikkel tot het ontstaan van krampen wordt weggenomen. De ontlasting is hard en komt te weinig voor (obstipatie). De oorzaak ligt bij een abnormaal bewegingspatroon van de dikke darm, hierdoor gaat de passage door de darm veel te traag. Door deze trage passage ontrekt de darm te veel vocht uit de ontlasting. Het gevolg van deze harde ontlasting is een pijnlijke stoelgang met occasioneel het ontstaan van aambeien of kleine kloofjes in de anus (fissuren). Het kan ook zijn dat de patiënt afwisselend last heeft van verstopping en diarree. Dit wordt veroorzaakt door een passage van de ontlasting die afwisselend te snel of te traag is. Door de heftige contracties en harde ontlasting wordt de binnenkant van de darm geïrriteerd en gaat deze extra slijm afscheiden. Dit is een teken van overprikkeling van de darmen. Sommige patiënten hebben uitsluitend diarree en geen obstipatie en/of buikpijn. Het gaat hier meestal om frequent lozen van een kleine hoeveelheid slijmerig materiaal. Soms echter worden er grotere hoeveelheden, meer waterige ontlasting geproduceerd, dit door een snellere passage doorheen het eerste gedeelte van de dikke darm. Deze snelle passage komt door abnormale dikke darm bewegingen, al dan niet gestuurd door abnormale elektrische activiteit. Bij deze klachten gaat het om een subgroep van IBS. Buiten de darmklachten kunnen IBS patiënten ook last hebben van niet-darm gerelateerde aandoeningen. Zuurbranden is een brandend gevoel achter het borstbeen dat wordt veroorzaakt door reflux van de zure maaginhoud. Dit terugstromen, kan aanleiding geven tot het ontstaan van ontsteking van het slokdarmslijmvlies (oesophagitis). Er zijn ook nog andere maagklachten, zoals dyspeptische klachten: misselijkheid, braken en een snel optreden 'vol gevoel' tijdens de maaltijd. Doordat de ontlasting langer aanwezig is in de buik, kunnen bacteriën langer en intensiever onverteerbare resten afbreken. Dit geeft aanleiding tot een opgeblazen gevoel en winderigheid [11].

1.2.2 De oorzaak van IBS

Geschiedenis

Van 1950 tot de vroege jaren 80 werd er gedacht dat verhoogde darm motiliteit de basis was voor IBS symptomen [12]. In het begin van 1970 werd er getracht om de specifieke markers voor de motiliteit bij IBS te identificeren. Er werd een karakteristiek 3-cyclus/minuut myoelektrisch patroon gevonden maar dit werd niet bevestigd in latere studies [12]. In 1980 werd een abnormale non-peristaltische fase 2 contractie van het proximale en distale deel van de dunne darm gevonden die specifiek was voor IBS patiënten [13] maar deze contracties waren in de helft van de gevallen niet geassocieerd met pijn. Deze patronen waren wel bruikbaar voor het identificeren van IBS maar waren niet goed genoeg om de symptomen te verklaren [12]. Door de mislukkingen om IBS te

verklaren aan de hand van verhoogde darmmotiliteit ging de nadruk meer en meer liggen op onderzoek naar viscerale overgevoeligheid. Zo bleek uit 'ballon uitzettingstesten' dat patiënten met IBS de ballon uitzetting sneller voelden bij lagere volumes en druk dan de controlepatiënten. Deze IBS patiënten hebben wel een normale pijngrens voor pijnsimulatie van somatische neuroreceptoren, hieruit blijkt dus dat de overgevoeligheid specifiek is voor de darmen. De mechanismen van viscerale overgevoeligheid worden op dit moment volop onderzocht. Het zijn verschillende factoren (genetisch, inflammatie, motiliteit, lokale mechanische irritatie van de zenuw, psychisch) die de neuroreceptoren en afferente zenuwgeleiding veranderen. Ook veranderingen van de afferente input van het centrale zenuwstelsel (CZS) geven op lange termijn een overgevoeligheid van de geleidingsbanen die betrokken zijn bij de transmissie van viscerale sensatie.

Heden

De functie van de darm wordt geregeld door het enteric nervous system (ENS). Het ENS is het neurale netwerk van de darm die sensatie en motoractiviteit reguleert. Het ENS bevat onafhankelijke lokale neurale netwerken die instaan voor het verwerken en versturen van prikkels, hierdoor kan het ENS gezien worden als een soort van 'hersenen in de darm'. De darm heeft bepaalde programma's opgeslagen voor verschillende patronen van darmgedrag. Zo bevat het ENS: motorische en secretoire programma's, feedback controle, reflexen en sensorische informatie processing [14]. Het CZS moduleert perifere intestinale motor of sensorische activiteit. Een evoluerende theorie is dat normale gastro-intestinale functie resulteert van een integratie van intestinale motor, sensorische, autonome en CZS activiteiten, en dat zo gastro-intestinale symptomen gerelateerd kunnen zijn aan een disregulatie van één van deze systemen. Deze domeinen interageren door middel van bidirectionele parallele circuits. Dit linkt viscerale afferente sensatie en intestinale motor functie met hogere corticale centra die hun activiteit moduleren en aanpassen. Hierdoor hebben extrinsieke (zicht, reuk) of enteroceptieve (emoties, gedachten) bronnen door de aard van hun neurale connecties de mogelijkheid om gastro-intestinale sensatie, motiliteit en secretie te beïnvloeden. Omgekeerd heeft een pijnstimulus een wederkerig effect op centrale pijn perceptie, stemming en secretie. Het lijkt er dus op dat fysiologische en psychologische factoren pijn en ander symptomen kunnen veroorzaken [12]. Hoewel de exacte oorzaak van IBS nog ongekend is, gaat het hedendaagse denken ervan uit dat IBS ligt aan een disregulatie van de interactie tussen het ENS en het CZS [15]. Het CZS en ENS zijn de 2 uiteindes van een as, deze as is de verbinding tussen viscerale darm sensatie en motor functie met de hersenen centra die darmsensatie, motiliteit en secretie beïnvloeden. Deze as is dus een systeem waarbij darmactiviteit een invloed heeft op de hersenen, en de hersenactiviteit de darmactiviteit beïnvloed. Een disregulatie van deze as draagt bij tot viscerale hypersensitiviteit en abnormale darmbewegingen, wat 2 belangrijke symptomen zijn bij IBS. Daarom wordt op dit moment de aandacht gelegd op de rol van serotonergische signalering en signalering met andere neurotransmitters [15][16].

De verschillende neurotransmitters van het CZS en ENS zijn de stoffen die een effect hebben de enterisch zenuw systeem bewegingsregulatie. Enkephalines, substantie P, Nitric

Oxide, Serotonine [5-HT] en andere hebben verschillende en geïntegreerde effecten op pijncontrole, gastro intestinale motiliteit, emotioneel gedrag en immuniteit [12]. 5-HT, een neurotransmitter in zowel het ENS als het CZS, is een sleutelmolecule bij viscerale hypersensitiviteit en verhoogde darm motiliteit bij IBS patiënten [17]. Het is aanneembaar dat de pijn en symptomen geïnitieerd kunnen worden door loslating van 5-HT door de enterochromaffine cellen, deze secretie ontstaat door chemische of mechanische stimulatie van de enterochromaffine cellen. De gesecreteerde 5-HT heeft 2 effecten: stimuleren van de extrinsieke afferente baan die betrokken is bij pijn perceptie door het CZS en stimuleren van intrinsieke afferente neuronen betrokken bij het initiëren van de intestinale motor respons [18].

1.2.3 Mestcellen en tryptase in IBS

Aangezien IBS gerelateerd is aan een veranderde spier - en zenuw functie, worden mestcellen gezien als kandidaten voor betrokkenheid bij IBS. Deze mestcellen hebben namelijk verschillende mediators die zowel inflammatoire als immuun - modelerende effecten hebben. Mestcel degranulatie en loslating van mediators wordt geassocieerd met factoren zoals stress, zenuw schade, infectie en verschillende inflammatoire aandoeningen. Daarbij zijn mestcellen dicht gelegen bij het ENS waardoor ze het potentieel hebben om veranderingen in zenuwfunctie en de ontwikkeling van verhoogde viscerale sensitiviteit te induceren. De mestcellen kunnen dus een belangrijke mediator zijn in de complexe interactie tussen een fysiologische gebeurtenis (darmschade, inflammatie, weefselschade, zenuw schade) en psychologische factoren (stressvolle gebeurtenissen, emoties) [19]. Er is ook gevonden dat er een verhoogd aantal mestcellen aanwezig zijn in de ingewanden bij IBS patiënten, voornamelijk in het terminale ileum [20] en het caecum [19].

Tryptase, wat losgelaten wordt door de mest cellen heeft verschillende proinflammatoire effecten en kan hyperalgesie (verhoogde gevoeligheid voor pijn) veroorzaken. In vergelijking met gezonde personen hebben IBS patiënten een 3 maal zo hoge aanwezigheid van tryptase - positieve mest cellen [21].

Bij IBS patiënten leiden zowel psychische als fysische stresssituaties tot vrijzetting van het corticotropin releasing hormone in de hypothalamus. Via de hersen/darm-interactie geeft dit aanleiding tot een activatie en destabilisatie van de mest cellen in het darmslijmvlies [22][23]. Hierdoor gaan de mestcellen onder andere tryptase en histamine vrijzetten, dit zal zorgen voor een verhoogde motiliteit die bv. in de vorm van examendarree tot uiting komt.

Omdat de oorzaak van IBS nog altijd onbekend is, is er meer onderzoek naar nodig om een accuraat beeld te krijgen van deze aandoening. Eén van de mogelijke wegen is het onderzoeken van de mediators die door de mestcellen worden vrijgezet. Daarom zal in dit kader getracht worden een systeem te ontwikkelen dat rechtstreeks in de darm van de IBS patiënt de concentratie van tryptase en histamine kan meten. Het systeem dat hiervoor gebruikt zal worden is een immunosensor. Een immunosensor heeft de lay-out van een standaard biosensor en gebruikt als biologische herkenningslaag antilichamen. Het

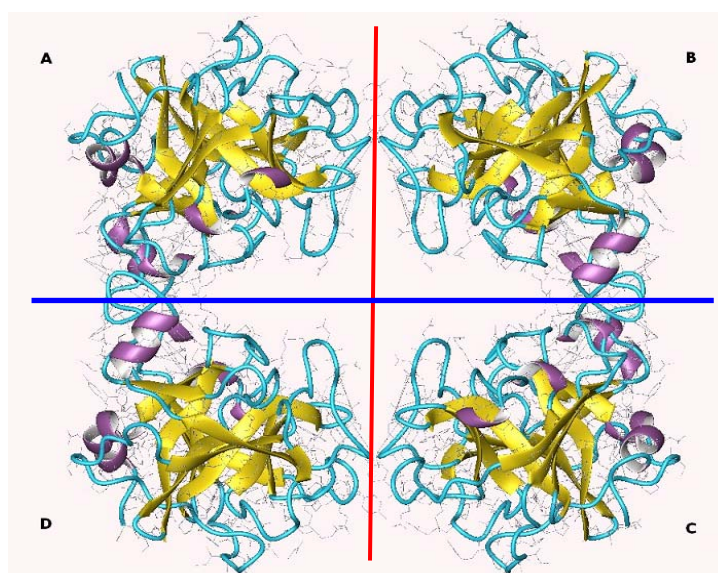
grootste voordeel van antilichamen is dat deze zeer specifiek zijn en enkel met het juiste analiet gaan binden.

1.3 De tryptase immunosensor

Een immunosensor bestaat uit verschillende componenten: analiet, biologische herkenningslaag, transducerlaag en elektroden.

1.3.1 Analiet

Tryptase is een tetramerische neutrale protease (Figuur 2) met een moleculair gewicht van circa 135 kDa en bestaat uit 4 niet-covalent gebonden subunits [24]. Er zijn 2 soorten van interfaces tussen de subunits, zo zijn er de A-B en C-D interfaces (rode lijn). Deze interface is voornamelijk gebaseerd op hydrofobe interacties en heeft een relatief kleine contact oppervlakte (540 \AA^2). De andere interfaces, B-C en A-D (blauwe lijn) bestaan uit hydrofobe interacties maar ook uit zoutbruggen en waterstofbruggen. De contact oppervlakte is ook groter dan bij de vorige interface (1075 \AA^2). Omdat de A-B en C-D interface zwak zijn moet tryptase gestabiliseerd worden. Dit wordt bewerkstelligd door heparine Proteoglycan en andere polymeren met hoog anionische ladingsdichtheid. In afwezigheid van heparine zal de tetrameer snel zijn activiteit verliezen omdat de tetrameer uiteenvalt in inactieve monomeren. De stabiliteit van de tryptase tetrameer kan in afwezigheid van heparine verhoogd worden bij hoge NaCl concentraties. Tryptase is van alle neutrale proteases in de mestcel (tryptases, chymases en carboxypeptidase A) het meest aanwezig.



Figuur 2: Tryptase [25].

Elke subunit van de tetrameer heeft een actieve enzyme site die gericht is op de nauwe centrale porie en heeft een sterke voorkeur van het klieven van substraten aan de C-terminale zijde van Arginine (Arg) en Lysine (lys) residues. Doordat de actieve sites naar de centrale porie zijn gericht, heeft tryptase een resistentie tegen endogene macromoleculaire protease inhibitors [26]. Door de Arg - Lys voorkeur klieft tryptase verschillende extracellulaire substraten zoals vasoactieve intestinale peptide, calcitonine gen-gerelateerde peptide, fibronectine en kininogenen. Tijdens inflammatie kan tryptase ook de release van granulocyt chemoattractant IL-8 stimuleren en ook zorgen voor een verhoogde expressie van ICAM-1 op epitheel cellen. Tryptase induceert ook de expressie van mRNA voor IL-1 β , welke belangrijk kan zijn voor het rekruteren van inflammatoire cellen naar de site van mest cel activatie. De release van tryptase door geactiveerde mestcellen kan de aanliggende mestcellen stimuleren om ook tryptase te secreteren, hierdoor wordt een versterkend effect verkregen [24].

Er bestaan 4 subsoorten tryptase: β -tryptase, α -tryptase, γ -tryptase en δ -tryptase.

β -tryptase is de meest voorkomende vorm die aanwezig is in de mestcel granules en is normaliter niet aanwezig in de circulatie. Tot nu toe zijn er 3 bijna indentieke β -tryptases geïdentificeerd: β I, β II en β III. β I en β III verschillen van β II doordat op plaats 142 van de aminozuren bij de eerste 2 een Asparagine (Asn) residu is en β II een lys residu heeft op deze positie. Hoewel β I en β II enkel verschillen op positie 142 is β III nog meer verschillend doordat plaats 60 – 63 bezet zijn door Arginin-Aspartic-acid-Arginine en bij β I en β II door Histidine-Glycine-Proline [26].

α -tryptase is tot nu toe in 2 vormen geïdentificeerd: α I en α II. De α -tryptases hebben een lagere activiteit dan de β -tryptases. Dit komt onder andere door een verandering op positie 216 van het aminozuur Aspartaan-zuur (α -tryptase) naar glycine (β -tryptase). Een andere verklaring ligt in het feit dat bij de substraat-herkenningsregio er een kink aanwezig is bij de α -tryptases. Deze kink zorgt ervoor dat substraat binding en verwerking onproductief is. α -tryptases zijn in tegenstelling tot de β -tryptases aanwezig in de circulatie, zelfs in de afwezigheid van mestcel degranulatie [26].

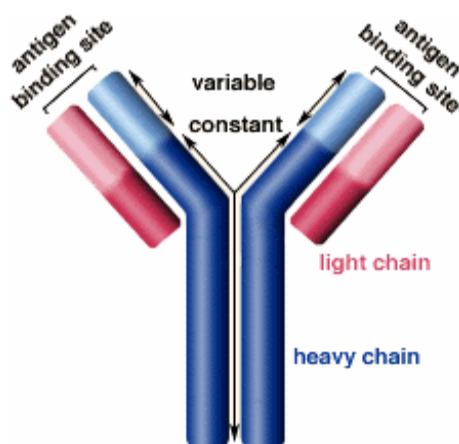
Ook voor de γ -tryptase zijn er 2 vormen geïdentificeerd: γ I en γ II. Ze worden tot expressie gebracht in zowel 'mast cell-like cell line (HMC-1) en luchtweg mestcellen. In tegenstelling tot α -tryptases en β -tryptases hebben γ -tryptases een hydrofoob C-terminaal domein gevolgd door een kleine cytoplasmatische staart, hierdoor zijn het hoogstwaarschijnlijk transmembranaire proteïnen die ofwel in het plasma membraan ofwel in de secretoire granules verankerd zitten. Naar alle waarschijnlijkheid zit γ -tryptase in de secretoire granules met de actieve zijde naar binnen gericht. Wanneer er degranulatie plaatsvindt, zal de actieve zijde naar de buitenkant van de cel gericht worden [26].

Wederom zijn er ook 2 vormen van δ -tryptases geïdentificeerd: δ I en δ II. De δ -tryptases hebben een prematuur stopcodon. Hierdoor zijn ze korter dan de andere tryptases maar hebben nog steeds hun katalytische activiteit. Alleen de substraat specificiteit zou

veranderd kunnen zijn. De δ -tryptases komen vooral tot expressie in weefsels zoals de darm, longen en hart maar ook in HMC-1 cellen [26].

1.3.2 De biologische herkenningslaag

De biologische herkenningslaag bestaat uit antilichamen die op een niet-covalente wijze gebonden worden aan de transducer laag. De simpelste antilichamen zijn Y-vormig en hebben 2 identieke antigen herkenningsplaatsen (Figuur 3).



Figuur 3: Schematische structuur antilichaam [27].

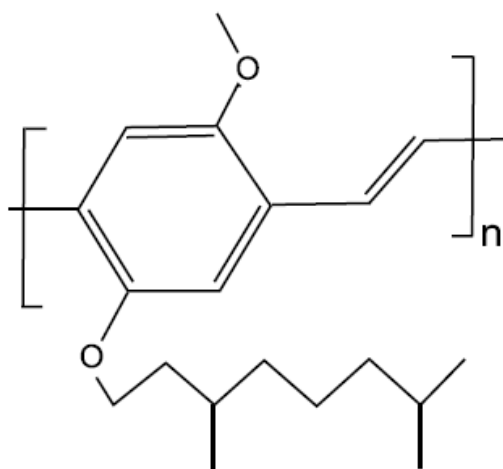
De efficiëntie van antigen binding wordt verhoogd doordat er ook een scharnier regio is die toelaat dat de afstand tussen de 2 herkenningsites kan variëren. De basisstructuur van het antilichaam bestaat uit: 4 polypeptide ketens, 2 identieke lichte ketens (elk 220 aminozuren) en 2 identieke zware ketens (elk 440 aminozuren). Deze 4 ketens worden samengehouden door een combinatie van niet-covalente en disulfide bindingen. Zowel de lichte als de zware ketens hebben variabele gebieden aan de N-terminale zijde en constante gebieden aan de C-terminale zijde. Voor lichte ketens is de constante regio ongeveer 110 aminozuren lang en heeft de variabele regio een vergelijkbare lengte. De zware ketens hebben ook een variabele regio van ongeveer 110 aminozuren maar een constante keten die 3 tot 4 maal langer is. Het zijn de N-terminale uiteindes van zowel de lichte als de zware keten die een antigen bindingsplaats vormen. De diversiteit van de antigen bindingsplaats wordt verkregen door verandering in de aminozuur sequentie. Die mogelijkheid tot diversiteit in zowel de lichte als zware keten is beperkt tot 3 kleine hypervariabele regio's in elke keten, de rest van de variabele regio's zijn constant en worden 'framework regions' genoemd [28]. De specifieke binding tussen het antilichaam en antigen wordt gemedieerd door een reeks zwakke fysicochemische krachten die samen een sterke binding geven. Deze krachten zijn: elektrostatiche krachten tussen geladen zijketens, waterstofbruggen, Van der Waals krachten en hydrophobe interacties [29]. Deze zwakke krachten zijn enkel effectief wanneer het antigen dicht genoeg is zodat sommige atomen passen in de complementaire bindingsplaats.

Er zijn 5 klassen van antilichamen:

- **IgM.** Dit antilichaam is voornamelijk aanwezig bij de vroege immuunrespons en heeft een pentamerische structuur bestaande uit 5 monomeren die gelijkaardig zijn met IgGs. Deze monomeren worden samengehouden met een 'joining chain'.
- **IgG.** Dit antilichaam is het meest aanwezig in het serum. Er bestaan 4 subklassen [IgG1 – IgG4]. Elk van deze subklassen heeft verschillende eigenschappen.
- **IgA.** Dit antilichaam is de voornaamste immunoglobuline in secreties zoals speeksel, melk en tranen, en het is ook sterk aanwezig in het mucosaal epitheel van de luchtwegen, genitale en intestinale tractus. De IgA die in secreties gevonden wordt, bestaat uit 2 IgA moleculen, een joining chain en een molecule van een secretoire component.
- **IgD.** Deze bevindt zich vooral op de oppervlakte van B cellen als een receptor molecule en is betrokken bij cel activatie.
- **IgE.** De binding van een IgE aan IgE-specifieke receptoren op mestcellen en basofielen in de aanwezigheid van antigenen zorgt voor een allergische reactie door de activering van de mestcel en het loslaten van mediators zoals histamine. IgE waren oorspronkelijk betrokken bij bescherming tegen parasitische infecties [30].

1.3.3 De transducer laag

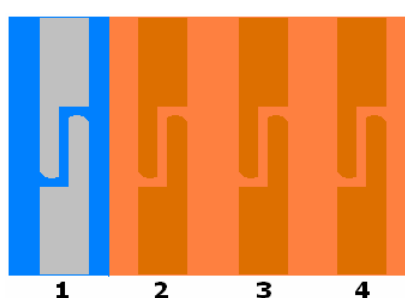
Het doel van de transducer laag is het converteren van de binding tussen het analiet en de biologische herkenningslaag naar een signaal dat elektronisch versterkt kan worden zodat het signaal opgeslagen en gemakkelijk geïnterpreteerd kan worden. OC₁C₁₀-PPV (polyphenylene-vinylene) (Figuur 4) wordt gebruikt als transducer laag. OC₁C₁₀-PPV is een geleidend polymeer waarop antilichamen via fysieke absorptie geïmmobiliseerd kunnen worden. Dit polymeer gedraagt zich als een p-type halfgeleider met een bandgap van 2,1 eV [31].



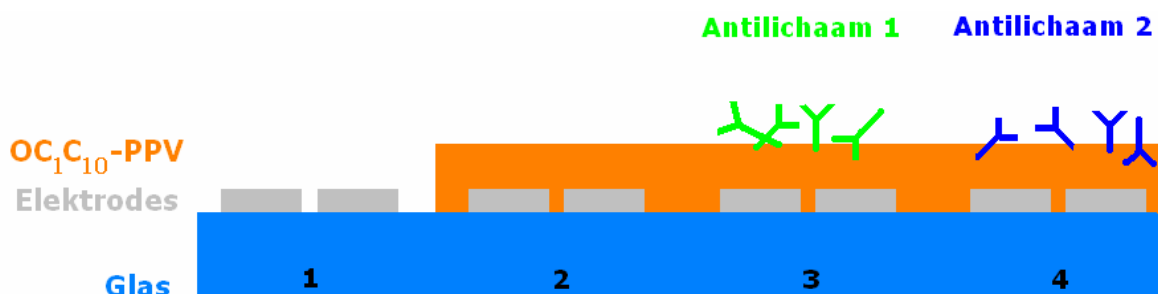
Figuur 4: Structuur formule OC₁C₁₀-PPV monomeer.

1.3.4 Sensor lay-out en data verwerking

De sensor bestaat uit 4 elektrodes die elk een andere configuratie hebben (Figuur 5 en Figuur 6). Kanaal 1 is de vrijgemaakte elektrode, kanaal 2 is de OC_1C_{10} -PPV elektrode, kanaal 3 is een OC_1C_{10} -PPV elektrode met daarop antilichaam 1 geïncubeerd, kanaal 4 is een OC_1C_{10} -PPV elektrode met daarop antilichaam 2 geïncubeerd. Één van de twee met antilichaam bezette kanalen is bedekt met anti-tryptase om effectief het analiet (tryptase) te binden en het andere kanaal wordt bedekt met een ander antilichaam, dit om de cross-reactiviteit te testen. De OC_1C_{10} -PPV elektrode wordt gebruikt om te kijken of er niet-specifieke bindingen aan het polymeer plaatsvinden. Om deze reden wordt ook één elektrode vrijgemaakt van OC_1C_{10} -PPV.



Figuur 5: Sensor lay-out bovenaanzicht.



Figuur 6: Sensor lay-out dwarsdoorsnede.

De detectie wordt gemeten aan de hand van een verandering in impedantie. Impedantie is een maat voor hoe sterk een circuit de flow van een elektrisch stroom kan tegenhouden. Impedantie is niet gelimiteerd aan simpele eigenschappen zoals een weerstand, namelijk dat het de wet van Ohm volgt voor alle stromen en voltage niveaus, dat de weerstand waarde onafhankelijk is van de frequentie van de Alternating current (AC) stroom en dat AC stroom en voltage signalen door een weerstand in fase zijn met elkaar.

De impedantie wordt gemeten door een AC potentiaal aan te leggen aan de sensor en de daaropvolgende stroom te meten die door de elektroden vloeit. Elk kanaal wordt apart gemeten om lekstromen van het ene naar het andere kanaal te vermijden. Met de gemeten informatie kan de verandering in impedantie weergegeven worden.

1.4 Doel van de tryptase immunosensor

IBS is een aandoening waar de oorzaak nog steeds onbekend van is. Omdat een groot deel van de bevolking (10 - 20 %) hieraan leidt is het belangrijk om hier aandacht aan te besteden. De richting die in het hedendaagse onderzoek wordt uitgegaan, concentreert zich op de effecten van verschillende mediators in het ENS en op de rol van mastcellen en hun destabilisatie. Om een beter beeld te krijgen van de rol van de mastcellen en het effect van een antioxidant dieet dat de mastcellen zou stabiliseren, is het nodig een beeld te hebben van de concentraties van de verschillende stoffen vrijgelaten door de mastcellen. Het probleem voor dit soort metingen is de locatie. De darm is een moeilijk bereikbare plaats om "on the spot" te meten daarom dat met de huidige manier van meten enkel in vitro de concentraties bepaald kunnen worden. Daar komt nog bij dat de huidige manier van meten omslachtig en onnauwkeurig is wegens een darmspoeling die niet aangenaam is voor de patiënt en een indampingsstap om de concentratie te verhogen. De uiteindelijke bepaling van de concentratie gebeurt door middel van ELISA, deze techniek laat niet toe om rechtstreeks in de darm de concentratie te bepalen. Daarom is er nood aan een nauwkeurigere en gemakkelijkere methode voor concentratiebepalingen in de darmen. Een intestinale biosensor die in vivo en op gepaste tijdstippen nauwkeurig concentraties kan bepalen is daarom beter geschikt dan de huidige methode. Met de vorige techniek is het mogelijk concentraties te winnen van rond de 200 pmol/ml. De detectielimiet van impedimetrische immunosensoren ligt naargelang de analiet in de orde van enkele pmol/ml [1]. In theorie zou de impedimetrische immunosensor een betere detectiemethode moeten opleveren dan de huidige methode want het werk is nauwkeuriger, minder omslachtig en er kan in vivo op de juiste locatie gemeten worden.

2. Materialen en Methoden

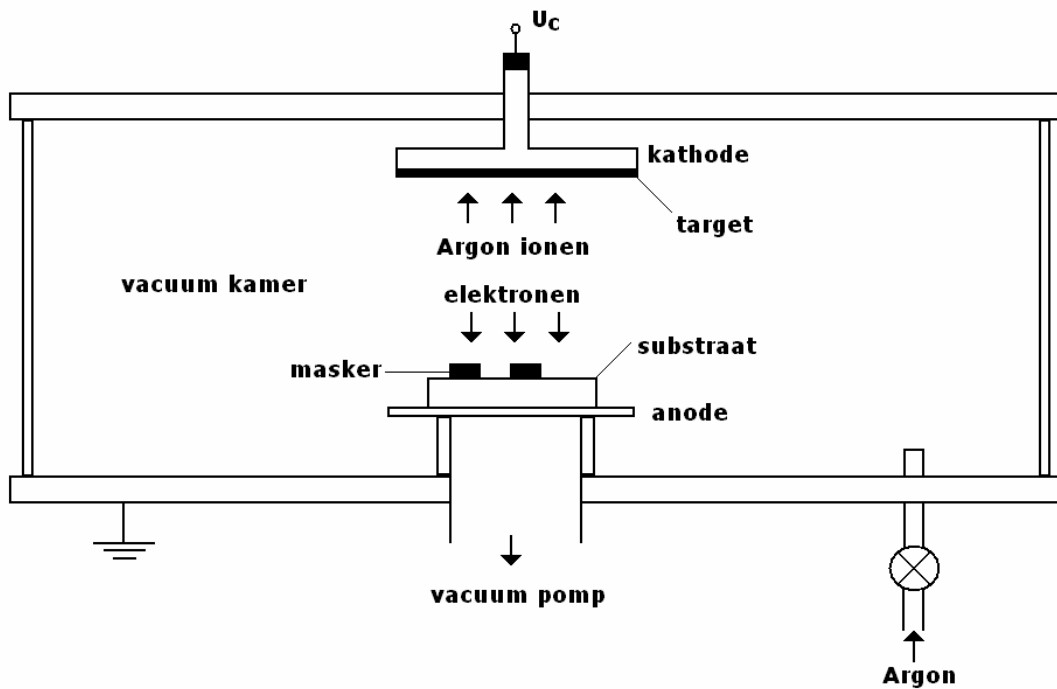
2.1 Sensor preparatie

2.1.1 Substraat preparatie

Als basislaag voor de sensor wordt een substraat gebruikt waarop de elektroden, transducerlaag en biologische geplaatst worden. Voor dit substraat wordt gekozen voor SiO₂ (glas) dat met behulp van een diamant pen gesneden wordt in plaatjes van 20 op 12 mm. Omdat de hechting van de elektroden en transducer laag op het substraat goed houdt, moet het glas eerst zuiver gemaakt worden. Als eerste stap worden de plaatjes met een stofvrije doek afgeveegd om eventuele vingerafdrukken en macropartikels te verwijderen. Om vetten van het substraat te verwijderen worden ze voor 30 min in een ultrasoon bad met 1 op 20 verdunde Buehler Ultramet 2 Sonic cleaning solution gespoeld. Om de zeepresten van de substraten te verwijderen worden de plaatjes grondig gespoeld met gedeïoniseerd water (18 MΩ*cm). Organische componenten worden van het substraat verwijderd door de plaatjes in aceton gedurende 10 min in het ultrasoon bad te plaatsen. Voor zeker te zijn dat alle organische componenten van het substraat weg zijn, wordt er nogmaals 10 min gespoeld in 2-propanol die op 80°C is gebracht. Op het zuivere substraat kunnen de elektroden aangebracht worden.

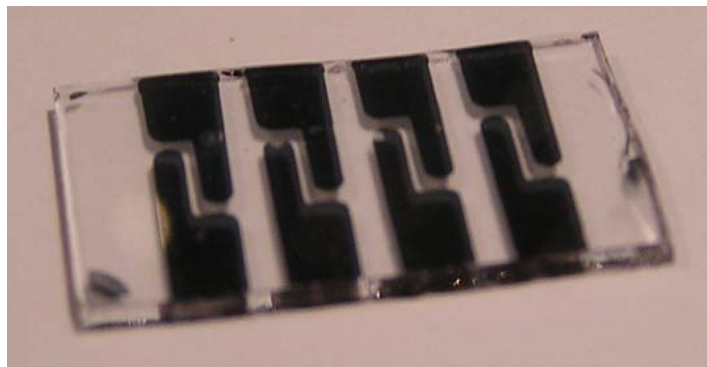
2.1.2 Elektroden

De gebruikte elektroden kunnen uit verschillende materialen bestaan: titaannitride (TiN), titanium (Ti), aluminium (Al), platina (Pt) en goud (Au). Om deze als dunne laag op het substraat te plaatsen, wordt er gebruikt gemaakt van sputteren (Figuur 7). Met deze techniek is het mogelijk om lagen van 70 nm aan te brengen op het substraat. Het substraat en het te sputteren metaal (target) worden samen in een vacuümketel gebracht. In deze ketel wordt argon (Ar) toegevoegd tot een druk van 0,001 – 0,1 hPa. Het substraat bevindt zich op aardpotentiaal en op het target wordt een negatieve voltage van enkele 100 Volt aangebracht. Door het sterke elektrische veld zet de kathode elektronen vrij die versneld in de richting van het substraat bewegen. Onderweg naar het substraat slaan ze elektronen uit de Ar-schillen: $\text{Ar} + e^- \rightarrow \text{Ar}^+ + 2 e^-$. Op hun beurt zullen deze elektronen ook botsen met Ar-atomen en ontstaat er een kettingreactie die zelfonderhoudend is.



Figuur 7: Lay-out van sputteropstelling [32].

De Ar^+ -ionen zullen worden aangetrokken door de kathode en zullen botsen tegen het target. Bij deze botsingscascade verlaten neutrale atomen het target en komen terecht op het substraat [32]. Zodoende wordt er een dunne laag op het substraat verkregen. Door een masker voor het substraat te plaatsen is het mogelijk om patronen op het substraat te sputteren (Figuur 8).

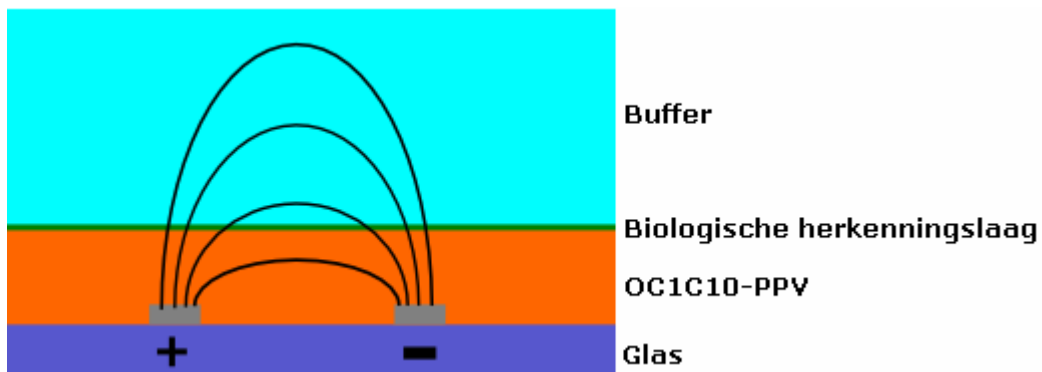


Figuur 8: Voorbeeld van gesputterde titanium elektroden.

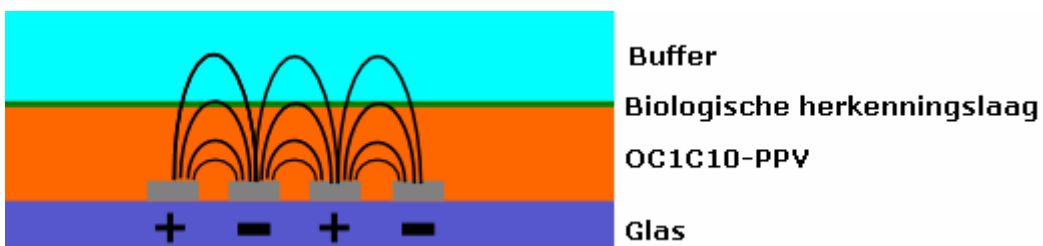
Deze elektrode structuur kan ook door etsen verkregen worden. Bij etsen wordt er vertrokken van een volledig gesputterd substraat. Op dit substraat wordt gedurende 40 sec met een snelheid van 1500 rounds per minute (rpm) negatieve resist (NR7-3000P, Futurex) gespincoat. Dit substraat wordt dan voor 30 sec belicht met een UV-lamp. Tijdens het belichten bevindt er zich een masker boven het substraat. Hierdoor zullen niet alle delen van het substraat belicht worden. Op de plaatsen waar de UV stralen komen, zal de negatieve resist afgebroken worden. De substraten worden vervolgens in een developer (RD6, Futurex) gebracht waar de negatieve resist die afgebroken is van het substraat gewassen wordt. Op dit moment is er dus een volledig gesputterd substraat met hierop

negatieve resist in een patroon naar keuze. De negatieve resist die nu nog aanwezig is op het substraat zal dienen als een beschermlaag voor de daar onderliggende gesputterde laag. Dit substraat wordt dan aangebracht in de etsvloeistof. Voor titaannitride is deze etsvloeistof waterstofperoxide (H_2O_2). De etsvloeistof zal dus de niet beschermde gesputterde laag van het glas weghalen. Als laatste stap wordt de overige resist van het substraat verwijderd door middel van aceton.

Naast deze gesputterde en geëtste elektroden, zal er voor de metingen ook gebruik gemaakt worden van Interdigitale elektroden (IDE) die verkregen zijn van IMEC. Deze elektroden hebben vingers die $25\ \mu m$ van elkaar verwijderd zijn. Er wordt verwacht dat deze elektroden gevoeliger zijn dan de gesputterde elektroden [33]. Bij de gesputterde elektroden gaan een groot deel van de elektrische veldlijnen ook in de buffer komen omdat de afstand van de twee vingers van de elektrode $1\ mm$ bedraagt (Figuur 9), met als gevolg dat maar een klein deel van het elektrische signaal effectief aan de biologische herkenningslaag meet. Door de afstand tussen de elektroden te verkleinen, gaan de elektrische veldlijnen niet zo ver moeten gaan (Figuur 10) en vloeien ze minder in de buffer en meer in de biologische herkenningslaag. Hierdoor wordt een effectiever elektrische signaal gemeten en zijn de elektroden sensitiever voor kleinschalige veranderingen in vergelijking met de coplanaire vingerelektrodes.



Figuur 9: Veldlijnen van coplanaire vingerelektrode.



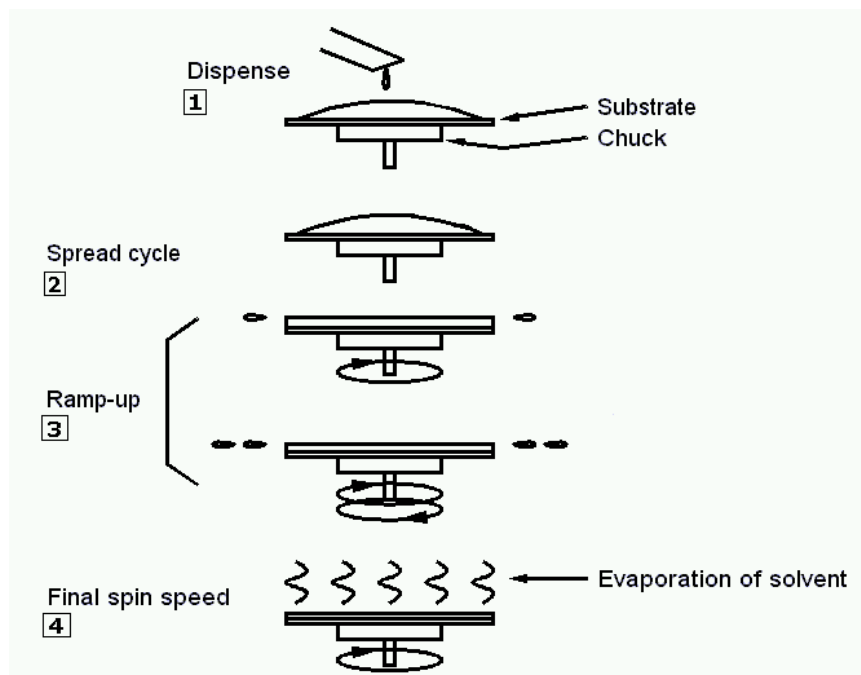
Figuur 10: Veldlijnen van interdigitale elektrode.

2.1.3 Transducer preparatie

Om OC₁C₁₀-PPV te gebruiken als transducerlaag moet deze eerst opgelost worden in chloorbenzeen zodat deze op het substraat gespincoat kan worden. Het OC₁C₁₀-PPV heeft een gewichtprocent van 0,7 waardoor deze gemakkelijk te spincoaten is in een homogene laag van 100 nm.

2.1.4 Spincoating

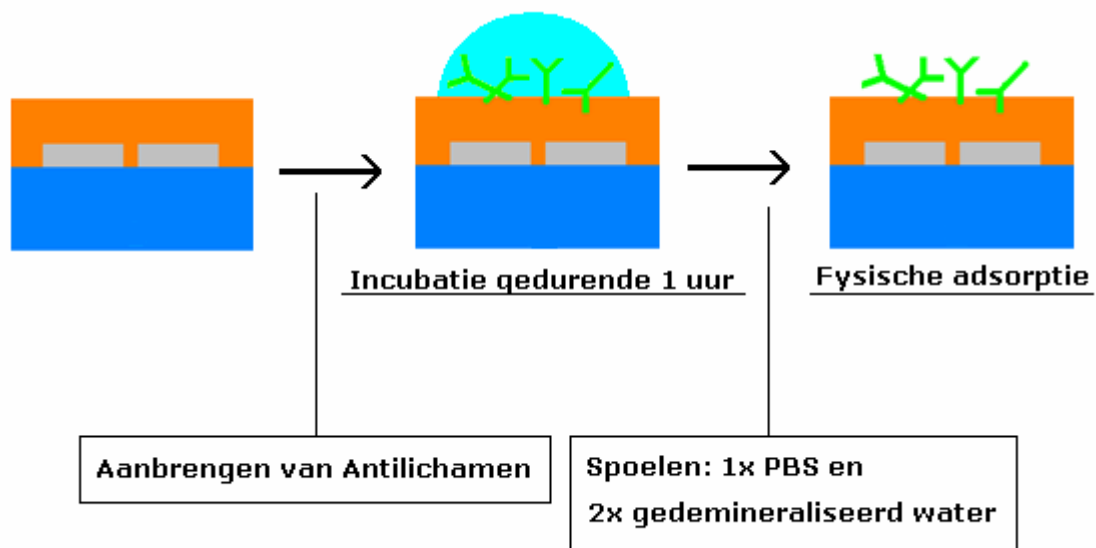
Als transducer laag voor de biosensor wordt OC₁C₁₀-PPV gebruikt. Om deze als dunne, uniforme laag aan te brengen op de met elektroden gesputterde substaten wordt de spincoat techniek toegepast (Figuur 11). Als eerste stap wordt het substraat in de houder van de spincoater geplaatst en wordt hierop een excessieve hoeveelheid opgeloste OC₁C₁₀-PPV op aangebracht (1), dit wordt statische verspreiding genoemd. In de eerste fase wordt het OC₁C₁₀-PPV gedurende 10 seconden volledig uniform verspreid over het substraat met een snelheid van 300 rpm en een versnelling van 300 rpm/sec (2). In de volgende fase gaan snelheid en acceleratie omhoog tot 3000 rpm en 500 rpm/sec respectievelijk en dit gedurende 10 sec. In deze fase wordt de dikte van de film bepaald (3). Deze dikte kan bepaald worden door de snelheid, tijd of concentratie van het OC₁C₁₀-PPV te veranderen. Als algemene regel kan genomen worden dat een hogere snelheid en een langere tijd zorgen voor dunnere films en hoe geconcentreerder de OC₁C₁₀-PPV hoe dikker de film zal zijn. In de laatste fase wordt er terug op een lagere snelheid van 500 rpm en een deceleratie van 300 rpm/sec gespint en krijgt het solvent gedurende 50 sec de kans om te verdampen zodat enkel de OC₁C₁₀-PPV achterblijft op het substraat (4) [34]. Met deze instellingen en met OC₁C₁₀-PPV van 0,7 gewichtprocent wordt er een transducerlaag van 100 nm verkregen.



Figuur 11: Opeenvolgende stappen bij spincoating [35].

2.1.5 Antilichaam incubatie

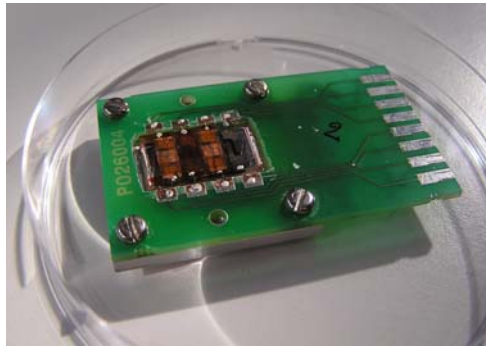
De Tryptase antilichamen (Genetex Inc. San Antonio, Texas USA, GTX22378) zijn van de IgG1 subklasse en bevinden zich in phosphate buffer solution (PBS). Ze worden door middel van incubatie op de transducerlaag aangebracht. Incubatie vindt plaats bij 37°C en duurt telkens 1 uur. Tijdens dit uur zullen de antilichamen zich fysisch adsorberen aan de transducerlaag. Na het uur worden de stalen 1x in PBS en 2x in gedemineraliseerd water gewassen (Figuur 12). De krachten die bij fysische adsorptie spelen zijn intermoleculaire krachten zoals van der Waalse krachten [36]. Van der Waals krachten zijn attractieve krachten tussen moleculaire entiteiten die niet gebaseerd zijn op bindingsformaties of door elektrostatische interacties van ionen of ion groepen met elkaar of met neutrale moleculen. Onder de term Van der Waals krachten wordt gerekend: dipool-dipool krachten, dipool-geïnduceerde dipool krachten en london krachten [37].



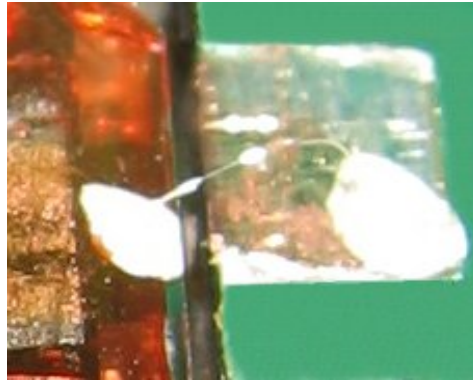
Figuur 12: Antilichaam incubatie proces.

2.1.6 Wirebonding

Om de sensor impedimetrisch te kunnen uitlezen moet deze verbonden worden aan een impedantiemeter. Daarom dat de sensor wordt gewirebond aan een printplaat die aangesloten kan worden aan de impedantiemeter (Figuur 13).



Figuur 13: Sensor en printplaat.



Figuur 14: Wirebond tussen sensor en printplaat.

De verbinding tussen de sensor en de printplaat wordt tot stand gebracht door een wirebonder. Dit is een machine (ME11204W, Marpet Enterprises Inc.) waarmee het mogelijk is een Al draad van 25 μm aan te brengen tussen de Sensor en de printplaat. De verbinding wordt versterkt door middel van zilverpasta (Figuur 14).

2.2 Karakterisatie

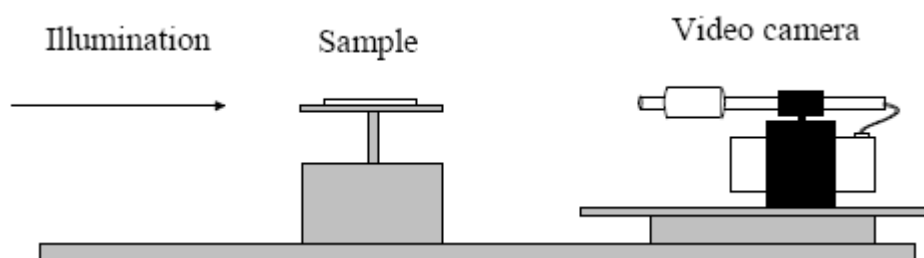
2.2.1 Dektak

De Dektak³ST wordt gebruikt voor het opmeten van oppervlakte profielen. Om dit oppervlakte profiel te verkrijgen, wordt er een mechanische stift over de oppervlakte getrokken. De verkregen output is een grafiek van de stifthoogte in functie van positie. Met deze informatie kan de staphoogte en oppervlakteruwheid bepaald worden [38]. Met deze meetmethode is het dus mogelijk om te verifiëren of de gespincoate transducerlaag wel degelijk een laag van 100 nm bedraagt. In hoge resolutie wordt er gescand over een lengte van 1000 μm .

2.2.2 Contacthoekmetingen

Contacthoek meting is een gemakkelijke en wijdverspreide manier voor het bepalen van de hydrofobiciteit van oppervlaktes. Op de sample oppervlakte wordt een waterdruppel van 1 μl aangebracht en met behulp van een videocamera (Figuur 15) wordt de hoek gemeten

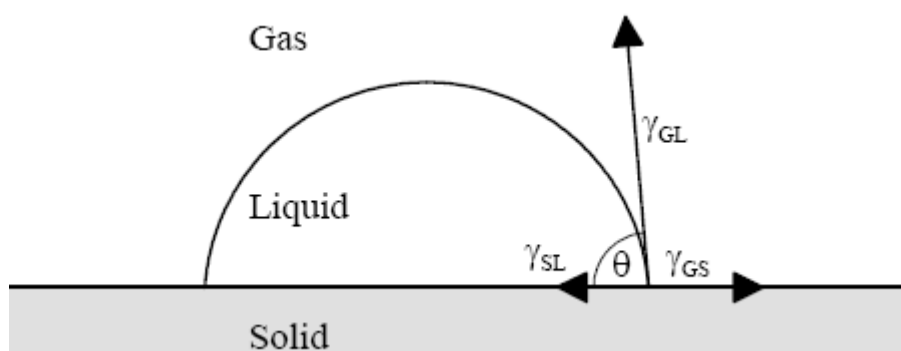
die de druppel en het oppervlak maken (Figuur 16). De contacthoek wordt gemeten met een OCA 15, plus, video based optical angle measuring device van dataphysics instruments GmbH.



Figuur 15: Contacthoek meting opstelling [39].

Bij ideale oppervlaktes geven de verschillende oppervlakspanningen: γ_{GL} (gas – liquid), γ_{GS} (gas-solid) en γ_{SL} (solid – liquid) de evenwichtshoek θ . Dit wordt bepaald via de Young vergelijking (vlg.1) [39].

$$\gamma_{GL} \cos\theta = \gamma_{GS} - \gamma_{SL} \quad (1)$$



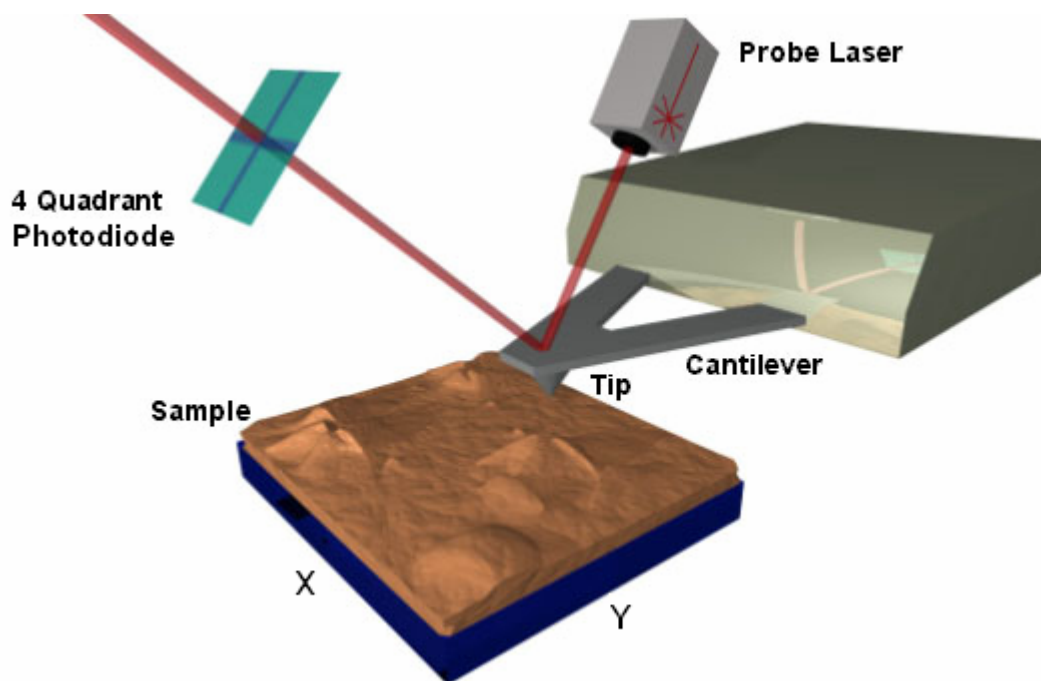
Figuur 16: Verschillende factoren van de contacthoek van een vloeistofdruppel [39].

Hoe kleiner de contacthoek wordt, hoe hydrofieler de oppervlakte is. Dit is omdat de druppel zich meer zal uitspreiden op een hydrofiel oppervlakte. Doordat bij adsorptie van antilichamen op OC_{10} -PPV de oppervlakte meer hydrofiel wordt naarmate de concentratie van de antilichamen hoger wordt, is het mogelijk om deze techniek toe te passen als methode voor het verifiëren van de adsorptie van de antilichamen op het OC_{10} -PPV.

2.2.3 Atomic Force Microscopy (AFM)

Net zoals bij contacthoekmetingen kan AFM gebruikt worden voor het bekijken en verifiëren van de aanwezigheid van de antilichamen op de transducerlaag. Een typische AFM (Figuur 17) bestaat uit een geïntegreerde cantilever-tip samenstelling, een laser, een detector die de cantilever verandering meet en feedback elektronica die voor constante meetparameters zorgt. Het staal bevindt zich op een piëzo-elektrisch translatieplatform en

kan in 3 dimensies (X,Y,Z) gemeten worden [40]. Het staal zal gescand worden in de X en Y richting en door veranderingen van de oppervlakte zullen de tip en cantilever in dezelfde mate mee bewegen. Om de verandering van de cantilever en de tip te bepalen wordt er gebruik gemaakt van een optisch systeem. Doordat de cantilever beweegt zal de laserstraal die via de cantilever op de plaatsgevoelige photodiode weerkaatst wordt ook van positie veranderen. Aan de hand van de grootte van de positieverandering kunnen de hoogte en breedte van structuren bepaald worden. Het is mogelijk om veranderingen tot 1 nm te detecteren [41].



Figuur 17: AFM set-up [42].

Voor AFM metingen zijn er verschillende meetmethodes voor handen.

Contact mode

Dit is de eerste methode waarmee gemeten werd en kan zowel in lucht als in vloeistoffen gebruikt worden. De tip wordt in contact gebracht met de oppervlakte van het staal en er wordt in een raster (X, Y) patroon gescand. De Z positie wordt bijgesteld tijdens het meten om een constante deflectie van de cantilever te behouden. De resulterende Z data van de raster scan geven een topografische weergave van de staal oppervlakte. Deze contact mode wordt voornamelijk gebruikt bij platte en harde stalen omdat er een grote laterale kracht door de tip wordt uitgeoefend op het staal. Pogingen om geïsoleerde biologische structuren in beeld te brengen, resulteren meestal in lage resolutie, staal beweging of schade aan het staal en daarom is contact mode voor bio-toepassingen niet aangewezen.

Tapping mode

In deze methode oscilleert de cantilever-tip samenstelling op zijn resonantiefrequentie en tikt de oppervlakte intermitterend aan tijdens de raster (X, Y) scan. Ook hier wordt de Z positie bijgesteld om de juiste oscillatieamplitude te behouden. Het grootste voordeel van de tapping mode is dat er praktisch geen laterale krachten aanwezig zijn en daarom geschikt voor het in beeld brengen van geïsoleerde biologische structuren [40].

Non-contact mode

Ook in deze mode oscilleert de cantilever-tip samenstelling bij zijn resonantiefrequentie maar raakt het staal niet aan. In deze mode wordt dus de aantrekking (Van der Waals kracht) tussen de tip en het staal gemeten. Hierdoor is de interactie tussen de tip en het staal zwakker dan bij contact mode. De tip – staal interactie krachten veranderen in zowel de effectieve resonantie frequentie en de amplitude van de oscillaties. Gedurende het scannen houdt een feedback loop de afstand tussen de tip en het staal constant door de resonantie frequentie te behouden (frequentie-modulatie mode) of door de amplitude van de oscillatie te behouden (amplitude-modulatie mode). Het grootste voordeel van deze techniek is dat de vorm van het staal nooit door de tip aangetast kan worden. Dit maakt deze techniek ook geschikt voor het bekijken van geïsoleerde biologische structuren [43].

2.3 Impedimetrische uitlezing

De wijze waarop de detectie van tryptase door de antilichamen zal bepaald worden, is door middel van impedimetrische uitlezing. Impedantie is een frequentie afhankelijke weerstand (R). Weerstand is een maat in hoeverre elektrische stroom door circuit elementen wordt tegengehouden. Weerstand volgt de wet van Ohm (vgl. 2) waarbij de weerstand de verhouding tussen Voltage (U) en Stroom (I) is.

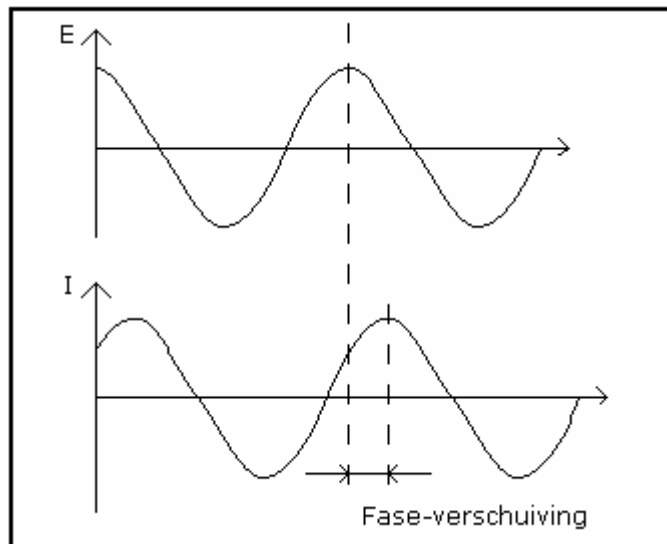
$$R = \frac{U}{I} \quad (2)$$

Het probleem met de wet van Ohm is dat er van een ideale weerstand uit gegaan wordt die verschillende eigenschappen heeft. De weerstand volgt de wet van Ohm voor elk voltage en stroom niveau, zijn waarde is onafhankelijk van de frequentie en AC stroom en voltage signalen door een weerstand zijn in fase met elkaar.

Omdat bovenstaande eigenschappen niet gelden voor complexe circuit elementen zoals capaciteiten en inductoren kan het concept van weerstand niet gebruikt worden. Daarom wordt er gebruik gemaakt van impedantie. Impedantie is gelijk weerstand een maat hoezeer een elektrisch circuit de vloeit van elektrische stroom weerhoudt maar impedantie wordt niet gelimiteerd door de simpele eigenschappen [44]. Capaciteiten en inductoren zijn frequentie-afhankelijk en er is een faseverschil tussen het AC voltage en de resulterende AC stroom.

2.3.1 Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)

Elektrochemische impedantie wordt meestal gemeten door een AC potentiaal aan te brengen op een elektrochemische cel en de resulterende stroom te meten. Als een sinusoidaal excitatie potentiaal wordt aangebracht dan zal daar een AC stroom signaal uitkomen met dezelfde frequentie en harmonische eigenschappen maar de amplitude zal verschillen en het signaal zal ook in fase verschoven zijn (Figuur 18).



Figuur 18: Sinusoidaal voltage excitatie signaal en resulterende AC stroom met faseverschuiving [44].

Het excitatie signaal heeft in functie van de tijd deze vorm (vgl. 3).

$$E(t) = E_0 \cos(\omega t) \quad (3)$$

$E(t)$ is het potentiaal op tijdstip t . E_0 is de amplitude van het signaal en ω is de radiale frequentie. De relatie tussen radiale frequentie ω (rad/seconde) en frequentie f (Hertz) is weergegeven in vgl. 4.

$$\omega = 2 \pi f \quad (4)$$

In een lineair systeem verschuift het respons signaal $I(t)$ in fase en heeft het een amplitude (I_0) (vgl.5).

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t - \phi) \quad (5)$$

Met een expressie analoog aan die van de wet van Ohm, is het mogelijk de impedantie van een systeem te berekenen, zoals te zien is in vlg. 6.

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cos(at)}{I_0 \cos(at - \phi)} = Z_0 \frac{\cos(at)}{\cos(at - \phi)} \quad (6)$$

Hieruit blijkt dat de impedantie uitgedrukt kan worden in een amplitude Z_0 en een faseverschuiving ϕ .

De impedantie kan ook weergegeven worden als een complex getal bestaande uit een reëel deel en een imaginair deel, zie vgl. 7 [44].

$$Z = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0 (\cos \phi + j \sin \phi) \quad (7)$$

2.3.2 Elementen en hun eigenschappen

Bij het meten van de sensor kan elk signaal gefit worden door een equivalent circuit dat uit verschillende elementen bestaat. Elk van deze elementen heeft zijn specifieke impedantie eigenschappen (Tabel 1).

Tabel 1: Lijst van equivalente elementen en hun impedantie

Equivalent element	Impedantie
Weerstand (R)	$Z = R$
Capaciteit (C)	$Z = 1/j\omega C$
Constant phase element (CPE) (Q)	$Z = 1/ Q_0(j\omega)^n$
Warburg (W)	$Z = 1/Q_0(j\omega)^{1/2}$

Een weerstand is onafhankelijk van de frequentie en heeft enkel een reële component.

Omdat een weerstand geen imaginaire component heeft zal de stroom door een weerstand altijd in fase zijn met de voltage.

Voor een capaciteit geldt dat naarmate de frequentie (ω) stijgt de Z kleiner gaat worden.

Een capaciteit heeft enkel een imaginaire impedantie component. De stroom door een capaciteit heeft een fase verschuiving van -90° ten opzichte van de voltage [44].

Een constant phase element is zoals de naam zegt een element waarvan de fase voor alle frequenties constant blijft. De waarde van de fase is gelijk aan $-(90 \cdot n)$ graden. Wanneer $n=1$ dan wordt $1/ Q_0(j\omega)^n = 1/j\omega C$. Wat wilt zeggen dat $Q_0 = C$ en de CPE zich zal

gedragen als een capaciteit maar de fase zal nooit exact 90° zijn maar er net onder liggen [45].

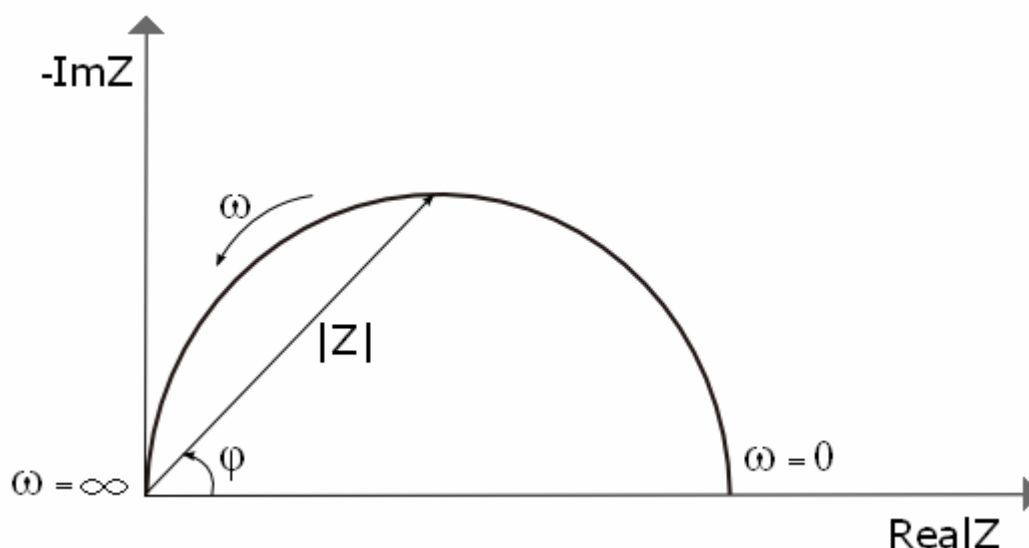
Een Warburg element wordt gebruikt om diffusie processen te modelleren. Het Warburg element is eigenlijk een CPE waarvan de fase 45° bedraagt en onafhankelijk is van de frequentie. De Warburg is uniek onder de CPE omdat het reële deel en het imaginaire deel dezelfde grote hebben en beide afhankelijk zijn van $1/\omega^{1/2}$ [46].

2.3.3 Data representatie

De verkregen data van de impedantie metingen kunnen op verschillende wijzen worden weergegeven. Elke manier van weergegeven heeft zijn voor- en nadelen.

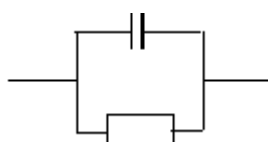
Nyquist plot

Zoals gezegd kan de impedantie weergegeven worden als een complex nummer bestaande uit een reëel deel en een imaginaire deel. Als het reële deel op de X-as wordt gezet en het imaginair deel op de Y-as wordt er een Nyquist plot verkregen (Figuur 19). De Y-as wordt in het negatief gezet en elk punt geeft de impedantie weer op een bepaalde frequentie.



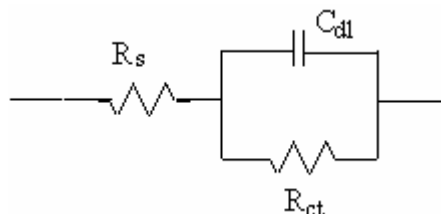
Figuur 19: Nyquist plot met impedantie vector [44].

De data van de lage frequentie wordt aan de rechterzijde weergegeven terwijl de data van de hoge frequentie aan de linkerzijde staat. Op de Nyquist plot kan de impedantie weergegeven worden door een vector met lengte $|Z|$ en waarvan de hoek gemaakt met de X-as gelijk is aan fase verschuiving. Elke Nyquist plot heeft een andere vorm voor elk circuit. Bovenstaande Nyquist plot resulteert van het equivalent circuit in Figuur 20. De halve cirkel van de Nyquist plot is karakteristiek voor een (RC) circuit.



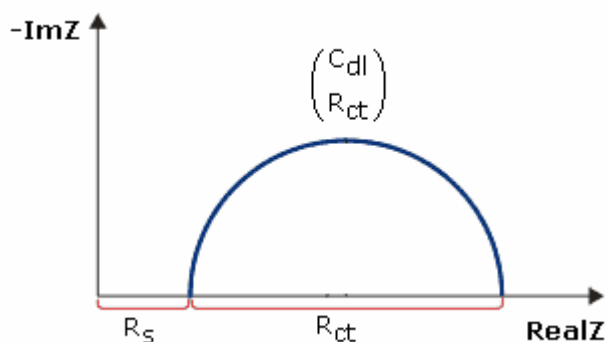
Figuur 20: Equivalent (RC) circuit.

Om aan te tonen dat Nyquist plots veranderen naargelang het toegepaste equivalente circuit wordt er ook gekeken naar een simpel en veelgebruikt circuit, de Randles Cell (Figuur 21).



Figuur 21: Randles Cell.

De Randles Cell bestaat uit een oplossingsweerstand (R_s), een dubbellaag capaciteit (C_{dl}) en een ladingsoverdracht weerstand (R_{ct}). De Randles cel is het model voor een elektrode in een solutie en dus ook het vertrekpunt voor meer geavanceerde sensoren. R_s is de weerstand van de solutie waar de elektrode zich in bevindt, C_{dl} is de dubbellaag die aan de elektrode gecreëerd wordt en R_{ct} is de weerstand van de ladingsoverdracht tussen de solutie en de elektrode. Voor dit equivalent circuit wordt de volgende Nyquist plot verkregen (Figuur 22).



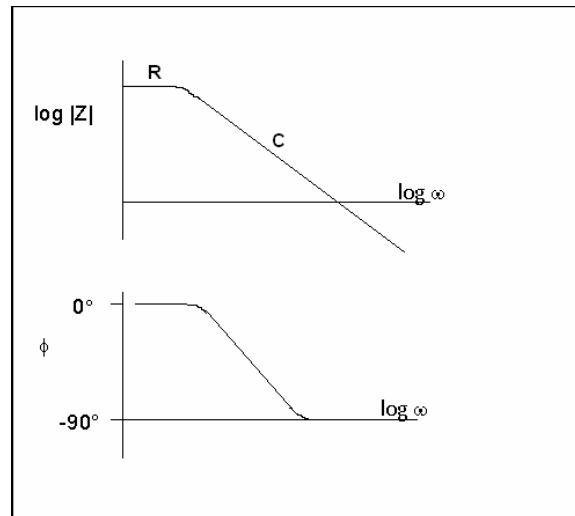
Figuur 22: Nyquist plot voor Randles Cell.

De weerstand van de solutie (R_s) kan afgelezen worden op de reële as bij de hoge frequentie kruising. Aan de andere kant van de reële as bij de kruising van de lage frequenties kan de som van R_{ct} en R_s afgelezen worden. De diameter van de halve cirkel is hierdoor gelijk aan de ladingsoverdracht weerstand. De halve cirkelvorm is typisch voor een capaciteit en weerstand die parallel staan.

Bode plot

Een andere populaire methode voor het voorstellen van impedantie data is de Bode plot. De impedantie wordt geplotted met de logaritmes van de frequentie op de X-as en zowel de log van de impedantie $|Z|$ en de faseverschuiving ϕ op de Y-as. In Figuur 23 staat de Bode

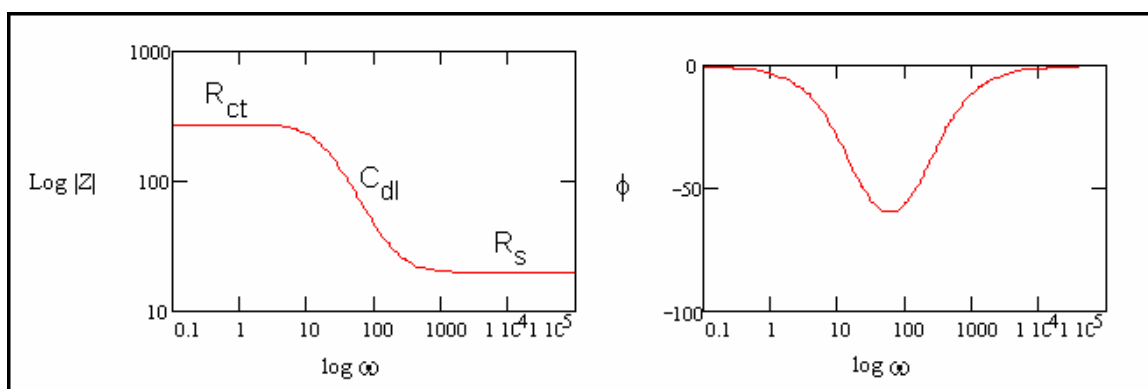
plot voor het circuit uit Figuur 20. In tegenstelling tot de Nyquist plot toont de Bode plot expliciet de frequentie.



Figuur 23: Bode plot voor RC circuit [44].

Uit Figuur 23 blijkt dat naarmate de frequentie stijgt de $|Z|$ daalt en de fase verschuiving richting -90° gaat. Dit komt door de invloed van de capaciteit die parallel staat met de weerstand. Een weerstand is onafhankelijk van de frequentie en heeft enkel een reële component. Omdat een weerstand geen imaginaire component heeft zal de stroom door een weerstand altijd in fase zijn met het voltage. Bij een capaciteit zal naarmate de frequentie (ω) stijgt de Z kleiner worden. Een capaciteit heeft enkel een imaginaire impedantie component en de stroom door een capaciteit heeft een fase verschuiving van -90° ten opzichte van de voltage.

Net zoals bij Nyquist plots zijn er voor elk circuit andere Bode plots. In Figuur 24 staat de Bode plot voor het Randles Cell circuit uit Figuur 21.



Figuur 24: Bode plot voor Randles Cell [44].

De oplossingsweerstand R_s en de som van de ladingsoverdrachtweerstand R_{ct} kunnen afgelezen worden van de $|Z|$ versus log frequentie grafiek. De fase verschuiving haalt niet

de -90° als het zou doen voor een pure capacatieve impedantie. Mochten de waardes van R_s en R_{ct} verder uit elkaar gelegen zijn dan zou de fase -90° benaderen.

Impedantie in functie van de tijd

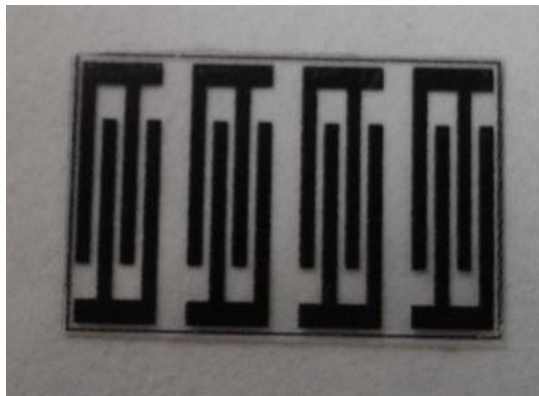
Naast de Nyquist en Bode plot is er nog een derde manier om impedantie te bekijken. In tegenstelling tot de Nyquist en Bode plot waar een heel frequentie spectrum getoond wordt, zal op de derde manier naar de impedantie gekeken worden in functie van de tijd en op één bepaalde frequentie. Dit is de meest courante manier voor het weergeven van impedantie verschillen bij toevoeging van analiet aan de biosensor. Op deze wijze kunnen zowel de amplitude als de fase weergegeven worden in functie van de tijd [44].

3 Resultaten en Discussie

3.1 Sensorpreparatie

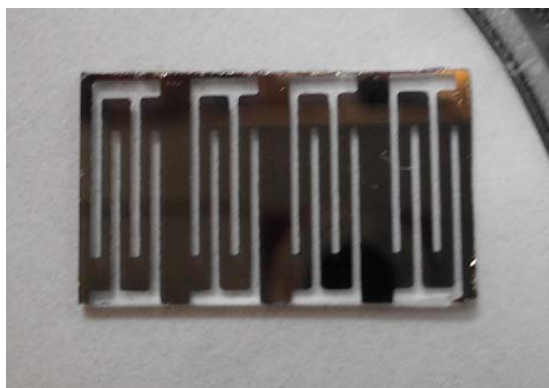
3.1.1 Etsen van de elektroden

Etsen is een alternatieve manier voor het verkrijgen van elektrodes op een substraat in het patroon dat gewenst is. Voor de ets testen wordt er gebruikt gemaakt van een masker met een interdigitale structuur gemaakt met 'macromedia freehand MX' en geprint op een doorzichtig slide (Figuur 25).

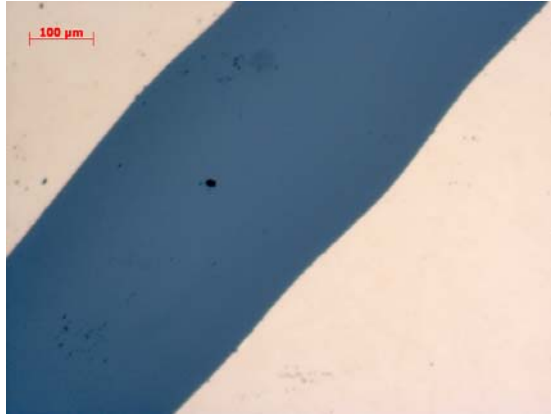


Figuur 25: Masker met interdigitale elektroden.

In Figuur 26 staat een geëtste TiN elektrode structuur. Op het eerste zicht is deze ets gelukt en ook na het bekijken onder de axiovert microscoop met een vergroting van 10x (Figuur 27) blijkt de ets geslaagd. Het blauwe gedeelte is het weggeëtste gebied en het beige gebied zijn de elektrodes. De goed afgeleide randen indiceren dat de resist de elektroden zeer specifiek heeft beschermd tegen het H_2O_2 . Dit wil ook zeggen dat het mogelijk is met een masker zeer specifieke gebieden te belichten en zo dus patronen naar keuze te etsen.



Figuur 26: Geëtste TiN elektrode.



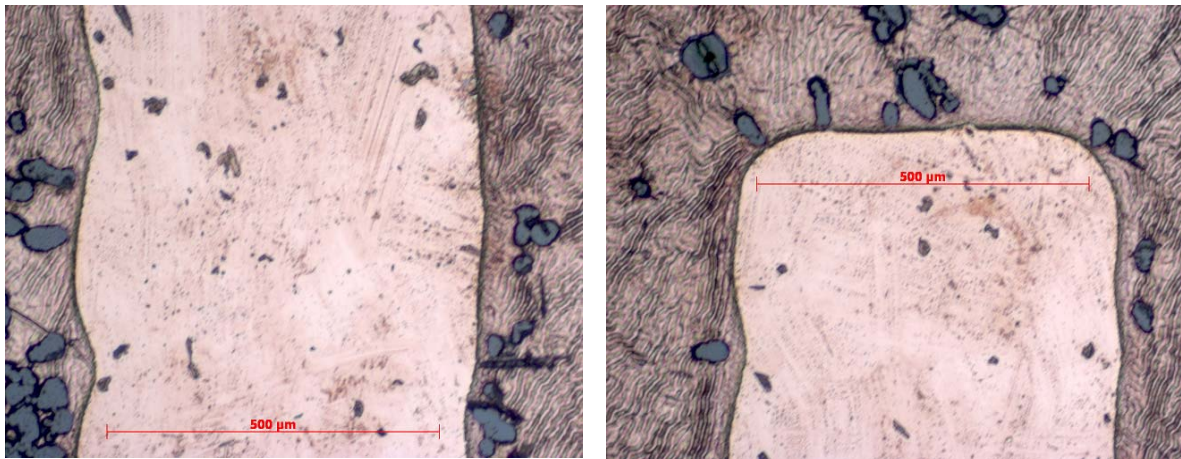
Figuur 27: detail beeld geëtste TiN elektrode (10x vergroting).

Bij herhaalde etspogingen blijkt echter dat deze methode niet optimaal is. Figuur 28 toont een TiN ets poging met het uitgeprinte masker.



Figuur 28: mislukte titraannitride ets.

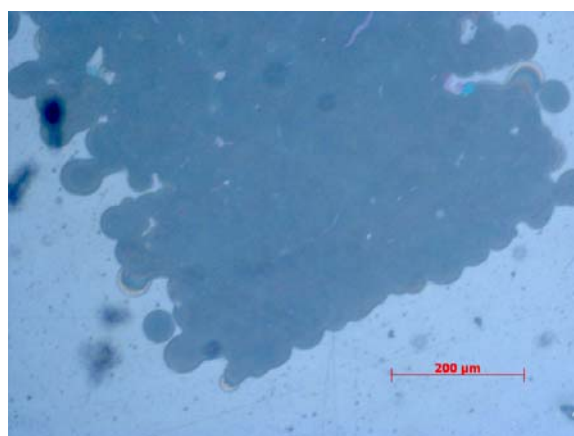
Het is duidelijk uit deze figuur dat TiN niet volledig weggeëtst is. De elektroden zijn wel zichtbaar wat wilt zeggen dat de resist de onderliggende TiN beschermd heeft. De reden dat de belichte gebieden niet weggeëtst zijn, kan verschillende oorzaken hebben. De UV-belichting is niet lang of krachtig genoeg, het staal heeft niet lang genoeg in developer gezeten om alle afgebroken resist te verwijderen ofwel is H_2O_2 niet krachtig genoeg om TiN te verwijderen. Ook uit de detail beelden blijkt dat er iets fout gelopen is met het proces (Figuur 29).



Figuur 29: Detail beelden van mislukte geëtste TiN elektroden (10x vergroting).

Uit Figuur 29 blijkt dat de elektroden lichtjes zijn aangetast door H_2O_2 maar het is ook duidelijk dat het resist de elektrodes wel grotendeels beschermd heeft tegen H_2O_2 . In het gebied langs de elektroden zijn er duidelijk gebieden die wel weggeëtsd zijn. H_2O_2 is dus sterk genoeg is voor het verwijderen van TiN maar kan niet aan de TiN raken. Dit kan enkel omdat er nog resist aanwezig is op de TiN, ofwel is het resist niet goed afgebroken ofwel is het resist niet goed gewegwassen door de developer.

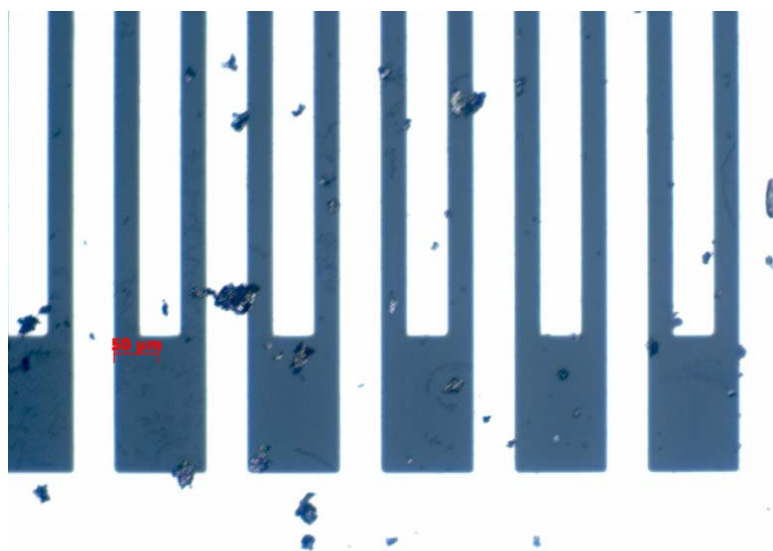
Het echte doel zijn interdigitale elektrodes met een afstand van $25\ \mu m$. Dit is niet mogelijk met de deze methode, niet door het negatieve resist, developer of etsproduct maar door de goedheid van het masker. Door simpelweg het masker af te drukken, wordt er nooit een goede resolutie verkregen om elektroden op microschaal te maken. Dit wordt duidelijk als de interdigitale elektroden van het masker onder de microscoop bekeken worden (Figuur 30).



Figuur 30: Masker onder 10x vergroting.

Het masker heeft duidelijk geen goede afgelijnde rand, hierdoor is de print-techniek niet toepasbaar voor het verkleinen van de interdigitale elektroden. Een techniek die dit wel

mogelijk maakt is lithografie. In Figuur 31 staan interdigitale elektroden met een duidelijke afgeijnde rand en tussen de elektroden een afstand van 25 μm .



Figuur 31: Interdigitale elektroden met afstand van 25 μm (10x vergroting).

De ets methode kan gebruikt worden voor het creëren van coplanaire macro-elektroden maar schiet tekort voor het creëren van interdigitale micro-elektroden. Omdat de condities voor het etsen nog niet op punt staan en er dus nog geen reproduceerbaarheid is, gaat de voorkeur voor het maken van deze elektroden nog altijd uit naar het sputteren, wat bovendien minder arbeidsintensief is. Etsen is een nuttige techniek maar is niet toepasbaar voor micro-elektroden en voor macro-elektroden zijn er snellere methodes mogelijk.

3.2 Karakterisatie metingen

3.2.1 Dektak

Met behulp van Dektak wordt de dikte van de transducerlaag opgemeten. Er worden 2 stalen opgemeten. In elk staal wordt één kras in het polymeer gemaakt. Elke kras wordt 3 maal gemeten (Tabel 2).

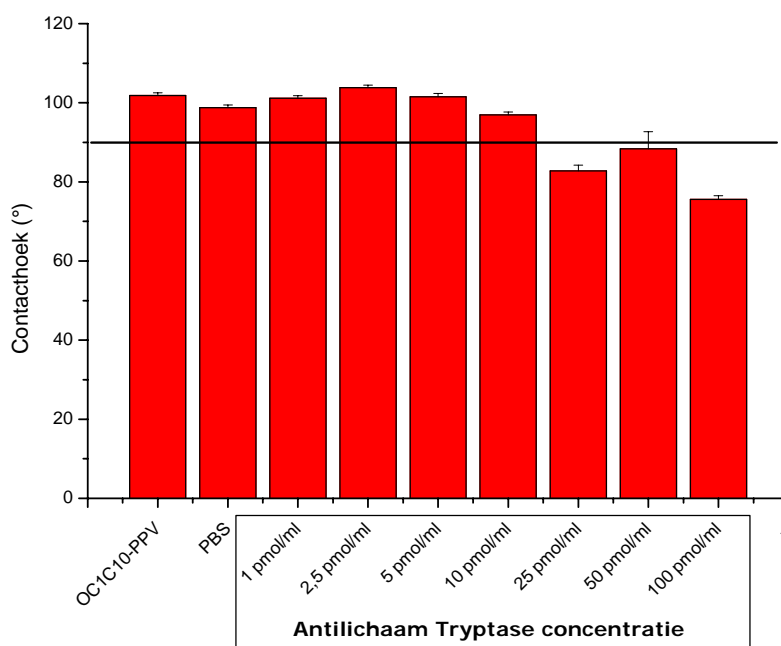
Tabel 2: Dektak meting van de OC_1C_{10} -PPV transducerlaag

	Staal 1 (nm)	Staal 2 (nm)
Meting 1	101,5	117,8
Meting 2	105,4	114,5
Meting 3	110,0	119,0
Gemiddelde per staal	$105,6 \pm 4,3$	$117,1 \pm 2,3$
Algemeen gemiddelde (nm)	$111,4 \pm 8,1$	

De algemene gemiddelde hoogte bedraagt $111,4 \pm 8,1$ nm, wat een goede dikte is voor een transducerlaag. Mocht de laag te dun zijn, zou de laag niet gesloten zijn. Als de laag te dik zou zijn, is de weerstand van de transducerlaag te hoog om impedantiemetingen mee te doen.

3.2.2 Contacthoekmetingen

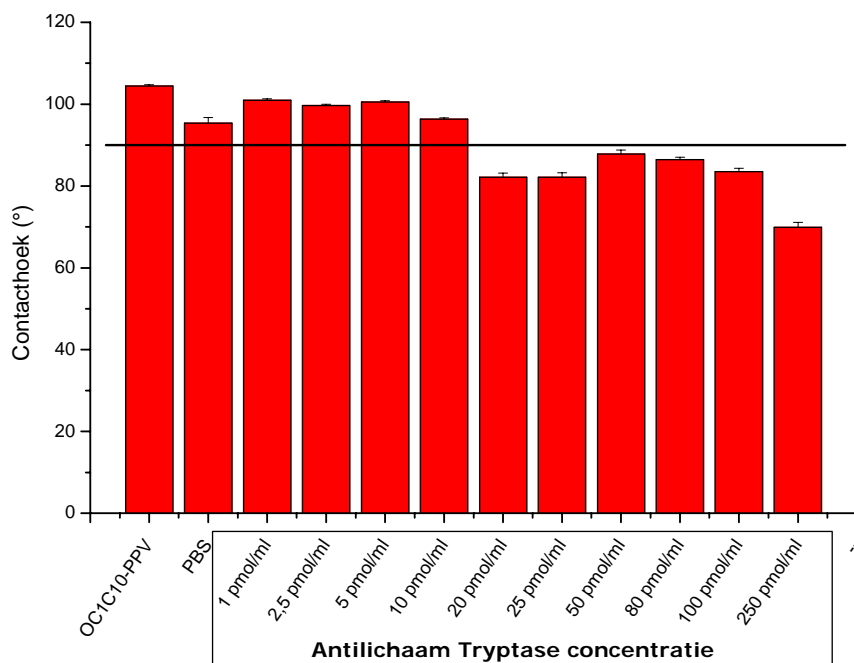
Om de incubatie van antilichamen op het OC₁C₁₀-PPV te verifiëren en om te kijken wanneer er verzadiging optreedt, wordt er gebruik gemaakt van contacthoekmetingen. Om de verzadiging te bepalen wordt een concentratie reeks van antilichamen aangemaakt. Elke concentratie wordt gedurende één uur geïncubeerd op 37°C. Als referentie worden zowel zuiver OC₁C₁₀-PPV als OC₁C₁₀-PPV met PBS gemeten. Na het uur worden de stalen 1x in PBS en 2x in gedemineraliseerd water gespoeld, ook de referentie stalen ondergaan deze behandeling. Op elk staal worden 3 metingen uitgevoerd gedurende 20 seconden. Tijdens die 20 seconden wordt om de seconde de contacthoek gemeten. Van al die data wordt het gemiddelde genomen en uitgezet in een staafdiagram (Figuur 32).



Figuur 32: Gemiddelde contacthoek van concentratiereeks trypsine antilichamen.

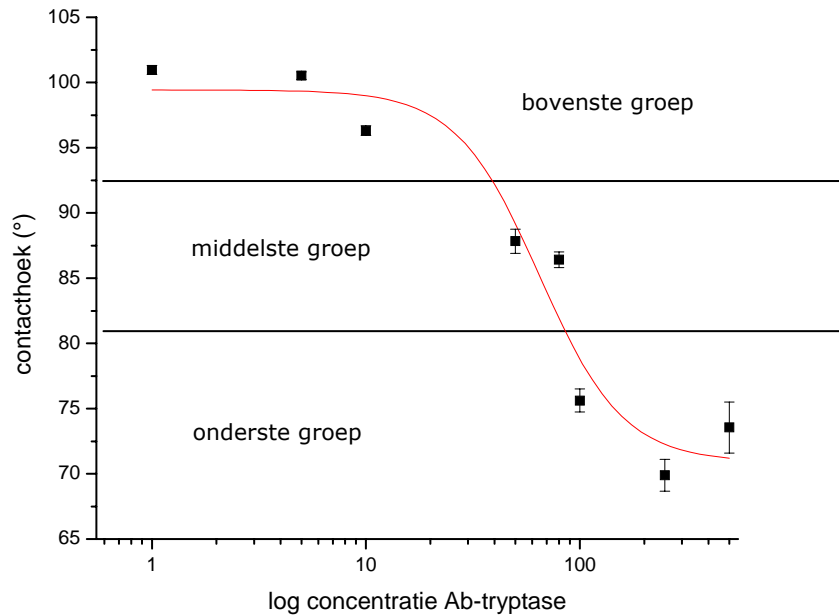
Figuur 32 toont een significante daling van de contacthoek ten opzichte van de referentiestalen vanaf 25 pmol/ml. De referentiestalen en de lage concentratie stalen aan antilichamen (1 – 10 pmol/ml) hebben een contacthoek van circa 100°. De stalen met een grote concentratie aan antilichamen hebben een contacthoek lager dan 90° waarvan het staal met de hoogste concentratie de laagste contacthoek heeft. Dit wil zeggen dat er meer antilichamen aanwezig zijn op het polymeer naarmate de concentratie van de geïncubeerde antilichamen stijgt. Er wordt wel verwacht dat de contacthoek zou blijven dalen naarmate de concentratie van geïncubeerde antilichamen stijgt maar het blijkt dat de contacthoek van 25 pmol/ml kleiner is dan die van 50 pmol/ml. Het is dan wel weer zo

dat het staal met de grootste concentratie de kleinste contacthoek heeft. Om dit verder te bekijken werd een tweede contacthoekmeting uitgevoerd maar nu met een grotere concentratiereeks. De vorige concentratiereeks wordt verder uitgebreid met 20, 80 en 250 pmol/ml geïncubeerde antilichamen (Figuur 33).



Figuur 33: Gemiddelde contacthoek van uitgebreide concentratiereeks tryptase antilichamen.

De contacthoek van de lage concentraties aan geïncubeerde antilichamen (1 – 10 pmol/ml) verschilt niet van de referentiestalen (Figuur 33). Ook hier ligt hun contacthoek rond de 100°. De contacthoek van geïncubeerde antilichamen met een concentratie hoger dan 10 pmol/ml is significant verschillend van de referentie stalen. De gemiddelde contacthoek van de hogere concentratie geïncubeerde antilichamen bedraagt $81,9^\circ \pm 6,4^\circ$. De stalen met concentratie 50, 80, 100 en 250 pmol/ml hebben een dalende trend. De verschillen tussen 50, 80 en 100 pmol/ml zijn licht van aard maar het verschil tussen 100 en 250 pmol/ml is significant groter. Dit is in lijn met de verwachtingen aangezien de concentratiesprong tussen 50, 80 en 100 pmol/ml gemiddeld 25 pmol/ml bedraagt en de sprong naar de hoogste concentratie 150 pmol/ml bedraagt. Om te bepalen of er verzadiging optreedt bij de incubatie wordt een laatste contacthoekmeting met ditmaal als hoogste concentratie 500 pmol/ml (Figuur 34).



Figuur 34: Verzadigingscurve van incubatie van tryptase antilichamen.

Figuur 34 toont een verzadigingscurve van geïncubeerde antilichamen. Alle concentraties worden logistisch uitgezet en er wordt een logistische fit door getrokken (Tabel 3).

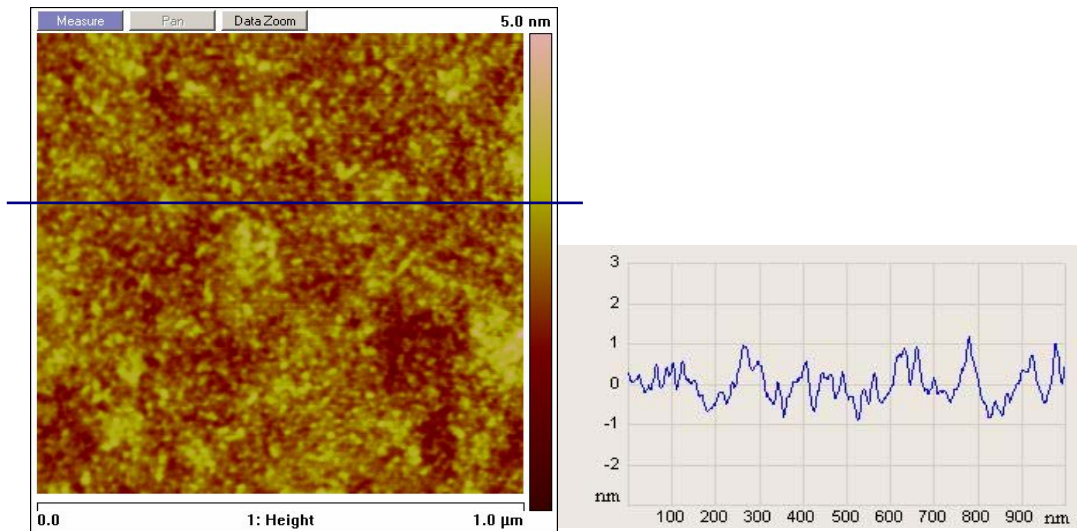
Tabel 3: Waardes voor logistische fit

Model: Logistic	
$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^{\rho})$	
R ²	0.94908
A1	99.42553
A2	70.90782
x0	64.88759
ρ	2.22262

A₁ is de hoogste saturatie waarde, A₂ is de laagste, X₀ is het centrum van het lineair regime en r indiceert hoe snel het saturatieniveau wordt bereikt. Er zijn 3 significante concentratiegroepen aanwezig. In de bovenste groep zitten de laagste concentraties, zij hebben de grootste contacthoek. Er is nog geen grote verandering van de contacthoek tussen deze concentraties. De middelste groep heeft een significant verlaagde contacthoek in vergelijking met de bovenste groep. De logistische fit binnen deze groep heeft een sterk dalend verloop, dit is conform met de verwachting van een dalende contacthoek bij stijgende antilichaam concentratie. De onderste groep heeft de laagste contacthoek van alle groepen. De logistische fit vlakt af in deze groep, wat wil zeggen dat er een verzadiging optreedt van het geïncubeerde oppervlak. Deze verzadiging van geïncubeerde antilichamen gebeurt vanaf een concentratie van 100 pmol/ml.

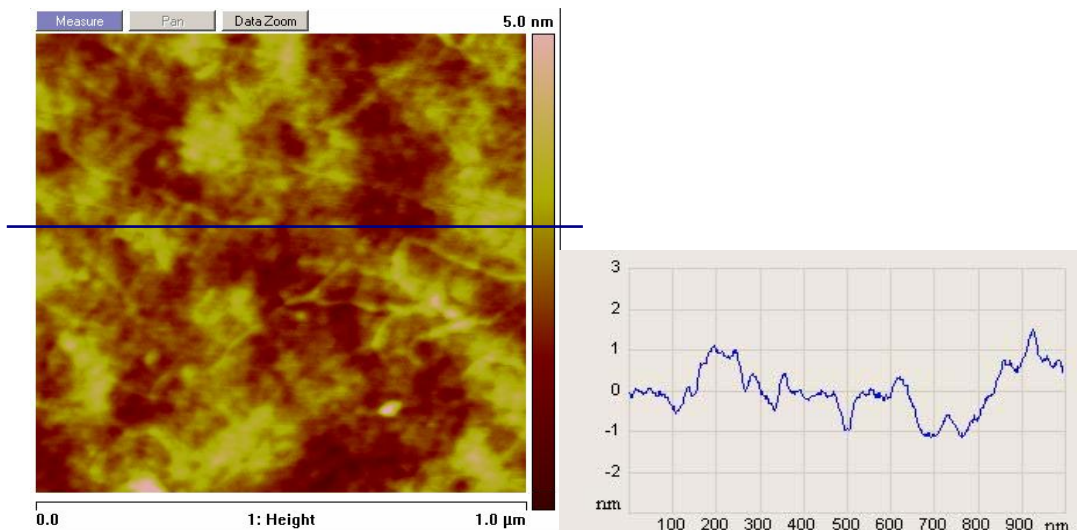
3.2.3 Atomic Force Microscopy

AFM wordt gebruikt als karakterisatiemethode om de hoeveelheid antilichamen en hun verdeling te bepalen. De AFM plaatjes worden allemaal bekeken op een schaal van $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ en met een hoogte profiel van 5 nm. De metingen werden uitgevoerd in de tapping mode en worden droog bekeken.



Figuur 35: AFM beeld en hoogteprofiel van OC₁C₁₀-PPV.

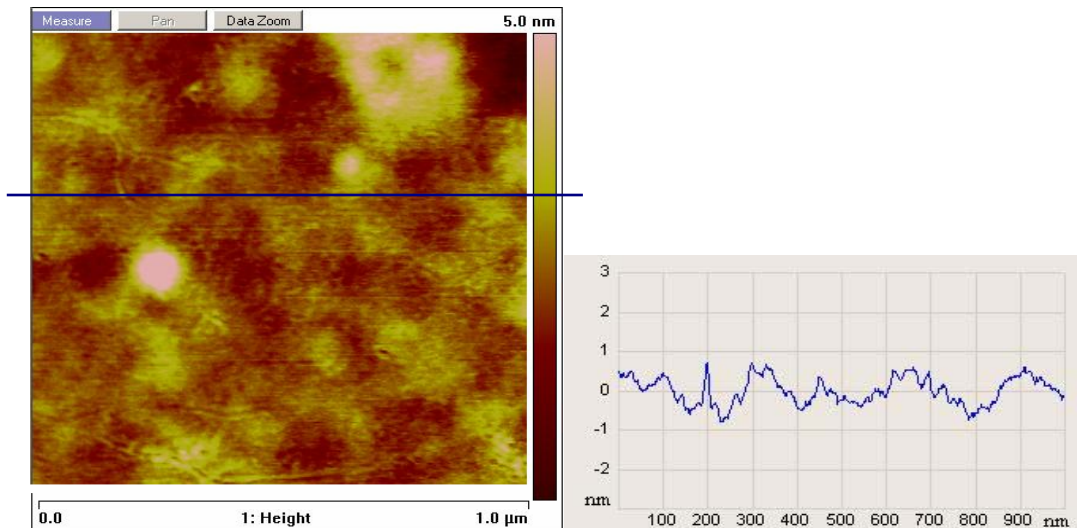
Uit Figuur 35 blijkt dat de oppervlakte van OC₁C₁₀-PPV relatief grillig is maar er kan wel over een glad oppervlak gesproken worden want het grootste hoogteverschil bedraagt maar circa 2 nm.



Figuur 36: AFM beeld en hoogteprofiel van PBS.

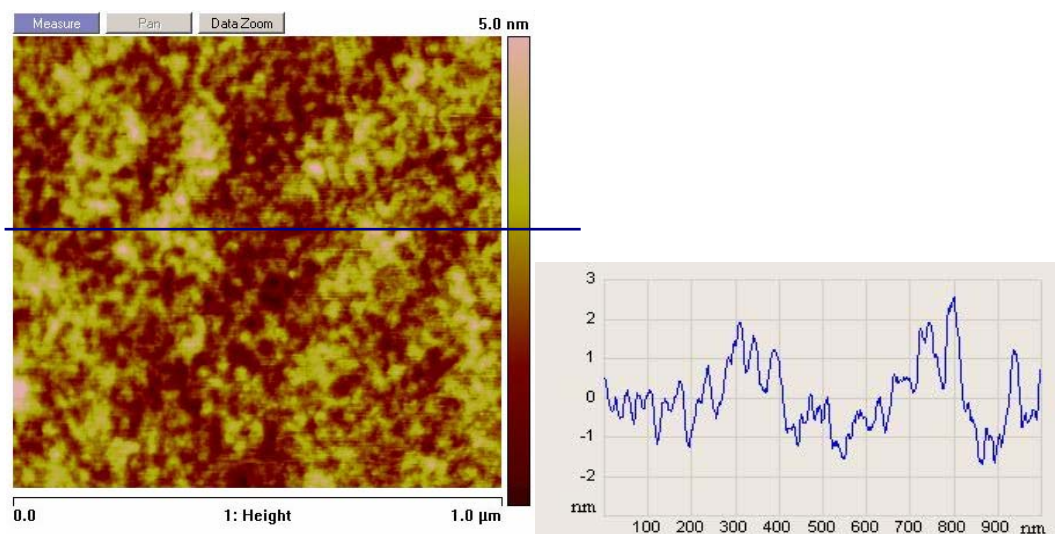
Bij de stalen met PBS geïncubeerd (Figuur 36) is er een minder grillig hoogteprofiel aanwezig dan bij de OC₁C₁₀-PPV stalen maar er is ook een maximum hoogte verschil van

circa 2 nm. Het minder grillig verloop van de met PBS geïncubeerde stalen kan verklaard worden door het feit dat PBS in de OC₁C₁₀-PPV matrix gaat binnendringen. Hierdoor gaat het oppervlak van het OC₁C₁₀-PPV egalier worden.



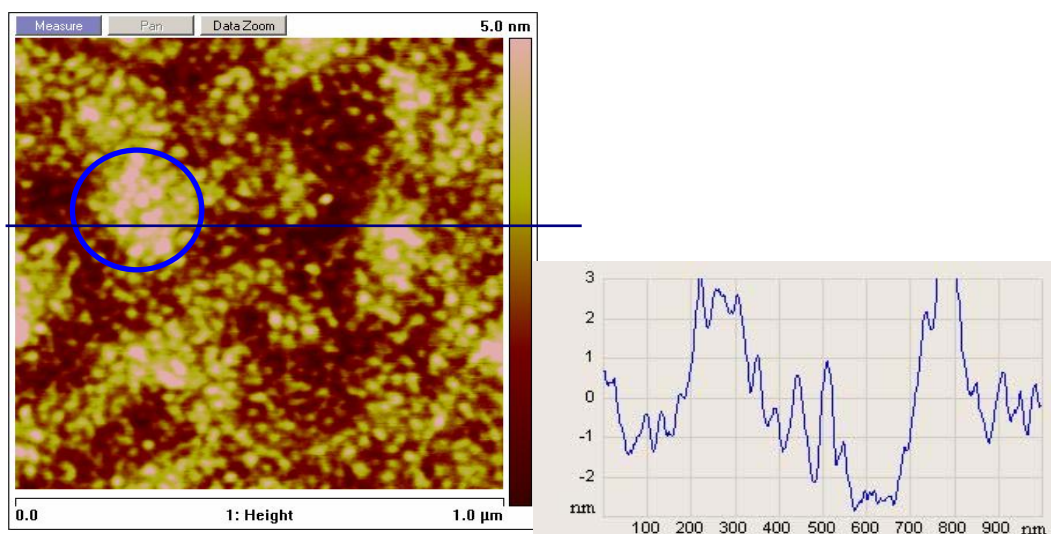
Figuur 37: AFM beeld en hoogteprofiel van 2,5 pmol/ml Ab tryptase.

Na incubatie van anti-tryptase antilichamen met een concentratie van 2,5 pmol/m (Figuur 37) is er geen verschil merkbaar met het PBS staal. Het AFM beeld is vergelijkbaar met dat van PBS en ook het hoogteprofiel is gelijkaardig met maximum hoogteverschillen van 2 nm. De hele heldere cirkels van het AFM plaatje zijn te hoog om antilichamen te kunnen zijn want de antilichamen worden binnen de 5 nm hoogteschaal verwacht. Het zijn dus hoogstwaarschijnlijk andere deeltjes die na de incubatie op het staal terecht zijn gekomen.



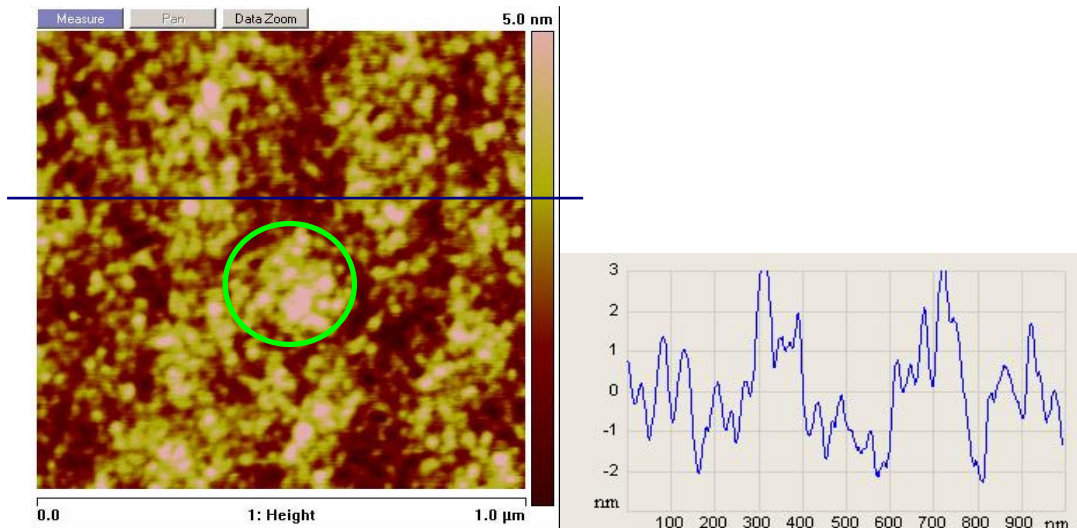
Figuur 38: AFM beeld en hoogteprofiel van 25 pmol/ml Ab tryptase.

Het staal met incubatie van anti-tryptase met een concentratie van 25 pmol/ml (Figuur 38) vertoont een duidelijk verschil met het staal met 2,5 pmol/ml antilichamen. De hoogteverschillen zijn beter afgelijnd en meer uitgesproken. Dit blijkt ook uit het hoogteprofiel, dat grotere verschillen bevat. Er zijn 2 grote pieken in het hoogteprofiel. De eerste piek van links beginnend heeft een verschil van circa 3 nm en de tweede piek heeft een verschil van circa 4,5 nm. De oppervlakte is dus ruwer dan het met 2,5 pmol/ml geïncubeerde staal wat wijst op een grotere aanwezigheid van antilichamen. Dit resultaat is consistent met de contacthoekmetingen waar er vanaf een antilichaam concentratie van 20 pmol/ml een significante verlaging van de contacthoek is, wat wijst op een grotere hoeveelheid antilichamen aan het OC₁C₁₀-PPV oppervlak.



Figuur 39: AFM beeld en hoogteprofiel van 80 pmol/ml Ab tryptase.

In Figuur 39 staan het AFM beeld en hoogteprofiel van incubatie van 80 pmol/ml antilichamen. Uit het hoogteprofiel blijkt dat er nog grotere hoogteverschillen zijn dan bij 25 pmol/ml antilichamen staal. Er zijn hoogteverschillen van meer dan 5 nm. Het AFM beeld laat zien dat op de plaatsen van deze grote hoogteverschillen er een soort van clustering van antilichamen lijkt plaats te vinden (blauwe cirkel), een soort piramide van antilichamen. De antilichamen vormen dus geen gesloten laag maar clusteren samen.



Figuur 40: AFM beeld en hoogteprofiel van 500 pmol/ml Ab tryptase.

Deze grote hoogteverschillen en clustering van antilichamen worden bevestigd in het AFM beeld en hoogteprofiel van de stalen met 500 pmol/ml geïncubeerde antilichamen (Figuur 40). Ook hier zijn er hoogteverschillen van meer dan 5 nm en is er ook clustervorming van de antilichamen aanwezig (groene cirkel). Op basis van deze AFM beelden en hoogteprofielen blijkt dus dat er geen verschil is tussen de concentratie van 80 pmol/ml antilichamen en die van 500 pmol/ml antilichamen. Er is wel een verschil in antilichaam bezetting zichtbaar tussen middelmatige concentraties (25 pmol/ml) en hogere concentraties (80 – 100 pmol/ml) antilichamen. Het is dus aangeraden te incuberen met concentraties hoger dan 25 pmol/ml.

3.2.4 Algemeen besluit

Als de informatie van de contacthoekmetingen en AFM bekeken worden, lijkt 100 pmol/ml de ideale concentratie om antilichamen mee te incuberen. Volgens de contacthoekmeting is er verzadiging van de oppervlakte vanaf 100 pmol/ml. Dit resultaat wordt bevestigd door de AFM metingen, waar bij een oppervlak van 100pmol/ml clustervorming optreedt en het oppervlak dus verzadigd is met antilichamen.

3.3 Impedimetrische uitlezing

Alle impedimetrische metingen werden uitgevoerd in een statische vloeistof cel (Figuur 41) aangesloten op een HP 4194A impedance/gain phase analyser.



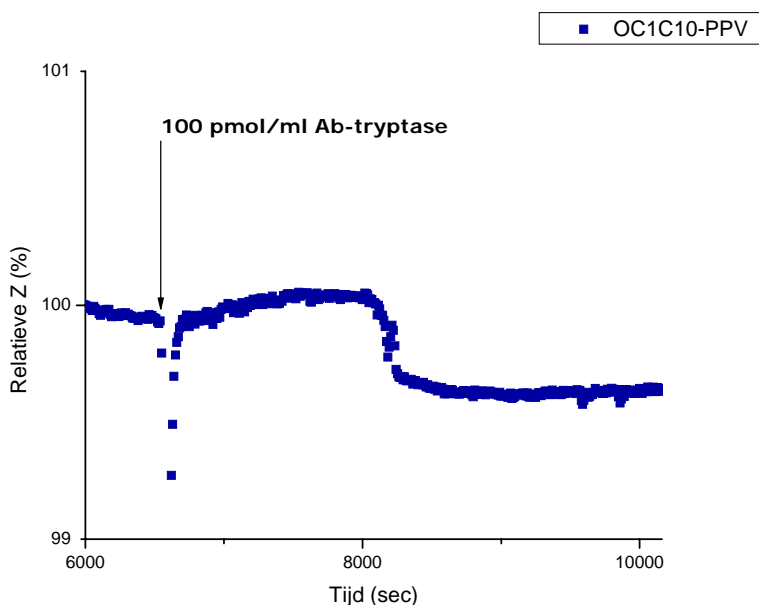
Figuur 41: Statische vloeistofcel.

Er wordt gemeten met een AC spanning van 50 mV en bij elke elektrode wordt om de 30 sec de resulterende AC stroom gemeten. Elke sensor wordt eerst gestabiliseerd met PBS. De duur van de stabilisatie verschilt per staal (van 30 min tot 1 uur). Alle sensor data wordt weergegeven vanaf dat de sensor gestabiliseerd is. Tijdens de metingen wordt er gebruik gemaakt van 2 verschillende soorten elektroden, de L-vormige gesputterde TiN elektroden en de interdigitale Al elektroden verkregen bij IMEC. Alle data waar de Z of relatieve Z in functie van de tijd gemeten wordt, zijn gemeten bij een frequentie van 212 Hz. Bij deze frequentie wordt er bij binding van het analiet door de antilichaam een capacitieve verandering verwacht en capacitieve effecten zijn het meest uitgesproken bij lage frequenties.

3.3.1 Incubatiemeting

Met een incubatiemeting is het de bedoeling om impedimetrisch de hechting van de antilichamen aan het OC₁C₁₀-PPV te detecteren. Bij deze meting wordt er gemeten bij 212 Hz en om te stabiliseren wordt er gebruik gemaakt van PBS. Eens de sensor gestabiliseerd is, wordt er Ab-tryptase (Antilichaam-tryptase) toegevoegd aan PBS zodat er in de vloeistofcel een antilichaam concentratie van 100 pmol/ml bevindt. De verkregen data wordt relatief uitgezet in de tijd (Figuur 42) en zo kunnen verandering ten opzichte van het stabiele signaal bekeken worden. De relatieve data wordt verkregen via vgl 8.

$$\text{Relatieve Z} = (|Z| / Z_{\text{stabiel}}) \quad (8)$$



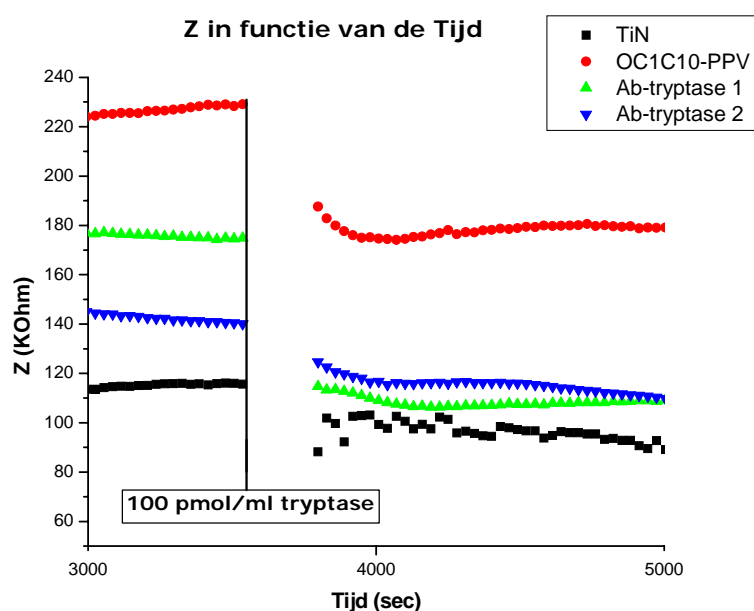
Figuur 42: Ab-tryptase incubatiemeting op 212 Hz.

De antilichamen worden voor één uur geïncubeerd op 37°C. Binnen dit uur vindt er een impedantiedaling plaats die wordt veroorzaakt door de fysische adsorptie van antilichamen

aan het OC₁C₁₀-PPV oppervlak. Hoewel fysische adsorptie onmiddellijk plaatsvindt, duurt het even voordat er hechting gedetecteerd wordt. Dit komt omdat bij normale incubatie de druppel met antilichamen rechtstreeks op het OC₁C₁₀-PPV aangebracht waardoor adsorptie sneller gaat vindt maar bij deze Incubatie meting worden er antilichamen toegevoegd aan een vloeistof die al aanwezig is in de vloeistofcel, waardoor de antilichamen nog eerst naar het oppervlak moeten diffunderen.

3.3.2 Coplanaire TiN elektroden

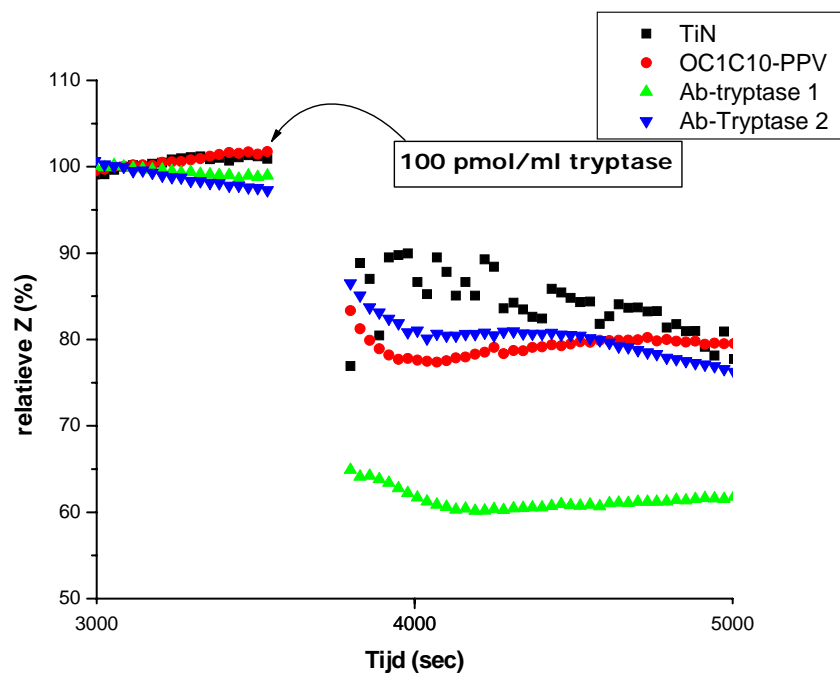
De sensor configuratie bij meting 1 (Figuur 43) bestaat uit 1 TiN kanaal, 1 OC₁C₁₀-PPV kanaal en 2 antilichaam tryptase kanalen met 100 pmol/ml antilichamen (Ab-tryptase 1 en 2).



Figuur 43: Meting 1 (TiN, OC₁C₁₀-PPV, Ab tryptase 1 en Ab tryptase 2), Z in functie van de tijd bij toevoeging 100 pmol/ml tryptase.

Tijdens de stabilisatie zijn er duidelijke verschillen in impedantie tussen de kanalen. Het TiN kanaal heeft naar alle verwachtingen de laagste impedantie. Er is een impedantieverschil tussen de 2 Ab-tryptase kanalen. Er wordt een impedantie verschil verwacht tussen de Ab-tryptase kanalen en het OC₁C₁₀-PPV kanaal omdat de Ab-tryptase kanalen een extra component (de antilichamen) hebben die de impedantie verandert maar wel niet in deze mate. Het impedantieverschil kan verschillende oorzaken hebben. Het kan liggen aan de integriteit van de OC₁C₁₀-PPV laag die beschadigd kan worden door PBS. Het kan ook aan de kwaliteit van de wirebond tussen de sensor en de printplaat liggen. Na de stabilisatie van alle kanalen wordt 100 pmol/ml tryptase (Sigma-Aldrich, T7063) toegevoegd aan de stabiele vloeistofcel. Tijdens dit toevoegen wordt de meting op pauze gezet, dit verklaart de grote ruimte tussen de 2 datapunten. Wat meteen opvalt is dat alle

kanalen hun impedantie zakt. De reden dat alle kanalen dalen, ligt in het feit dat de tryptase die wordt toegevoegd in een oplossing zit met een hoge NaCl concentratie (1 mol/l). Dit toevoegen van extra ionen zorgt voor een impedantie daling voor alle kanalen. Om een beter beeld te krijgen van het effect van de toevoeging van tryptase wordt de data volgens vgl. 7 relatief uitgezet (Figuur 44).

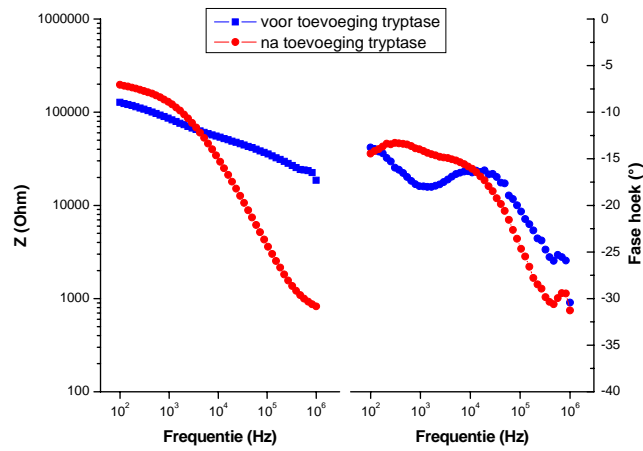


Figuur 44: meting 1 (TiN, OC₁C₁₀-PPV, Ab-tryptase 1 en Ab-tryptase 2), relatieve Z in functie van de tijd bij toevoeging 100 pmol/ml tryptase.

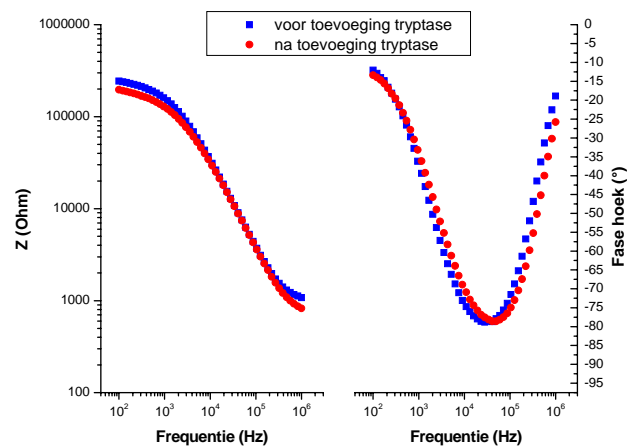
Met de relatieve Z in functie van de tijd blijkt dat de impedantie daling niet hetzelfde is voor alle kanalen. Het Ab-tryptase 1 kanaal heeft een meer uitgesproken daling dan de andere 3 kanalen. Het Ab-tryptase 1 kanaal heeft een daling van circa 38% terwijl het TiN kanaal de minste daling heeft met circa 13 % en het OC₁C₁₀-PPV en Ab-tryptase 2 kanaal een daling hebben van circa 20 %. Dit wil zeggen dat het Ab-tryptase 1 kanaal 18 % sterker daalt dan de het OC₁C₁₀-PPV kanaal. Deze grotere daling komt door de specifieke binding van tryptase aan de antilichamen. De daling van de impedantie van de andere kanalen kan veroorzaakt worden door aspecifieke adsorptie van tryptase aan de oppervlaktes van de kanalen en door de toevoeging van de buffer waar de tryptase in zit. Voor het Ab-tryptase 2 kanaal wordt een daling gelijk aan het Ab-tryptase 1 kanaal verwacht maar de daling is gelijk aan die van OC₁C₁₀-PPV, net alsof er geen antilichamen op het oppervlak van het Ab-tryptase 2 kanaal aanwezig zijn.

Bode plot

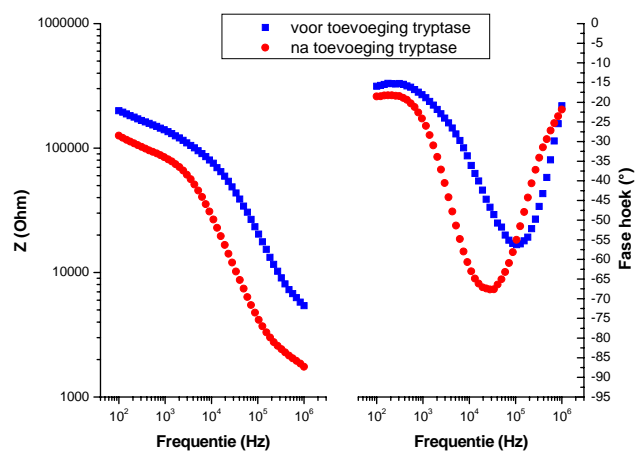
De Bode plot kan meer duidelijk scheppen in wat er gebeurd is na de toevoeging van 100 pmol/ml trypase.



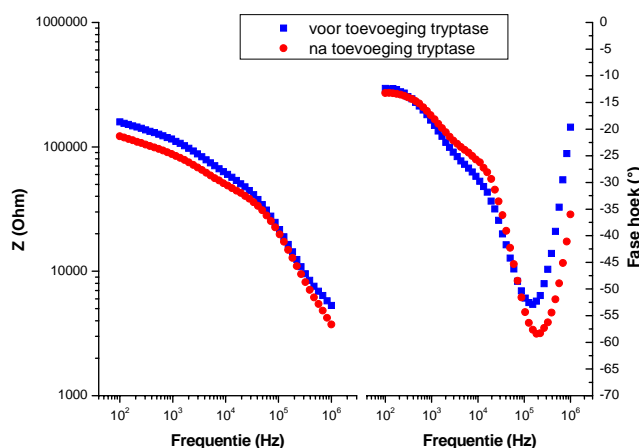
Figuur 45: Bode plot TiN kanaal.



Figuur 46: Bode plot OC₁C₁₀-PPV kanaal.



Figuur 47: Bode plot Ab-trypase 1 kanaal.



Figuur 48: Bode plot Ab-tryptase 2 kanaal.

Voor de toevoeging van tryptase heeft de impedantie van het TiN kanaal een meer resistief verloop dan na de toevoeging van tryptase omdat de curve rechter loopt en dus minder onder de invloed is van de frequentie (Figuur 45). Na toevoeging is er dus meer een capacitief verloop van de impedantie omdat de Z daalt in functie van de frequentie, dit is typisch voor een capaciteit. Dit kan verklaard worden door aspecifieke binding van tryptase op de TiN elektroden, deze binding van tryptase zorgt voor een versterking van de dubbellaag die een capacitief effect geeft.

Bij de Bode plot van het OC₁C₁₀-PPV kanaal (Figuur 46) is er voor toevoeging al een capacitief verloop, dit is een effect van de OC₁C₁₀-PPV. Het capacitief verloop is ook te halen uit de fasehoek die richting de -90° gaat, wat karakteristiek is voor capaciteit. Na toevoeging is er een lichte impedantiedaling door de toevoeging van de oplossing waar de tryptase in zit bij de lage frequenties maar de fasehoek blijft behouden.

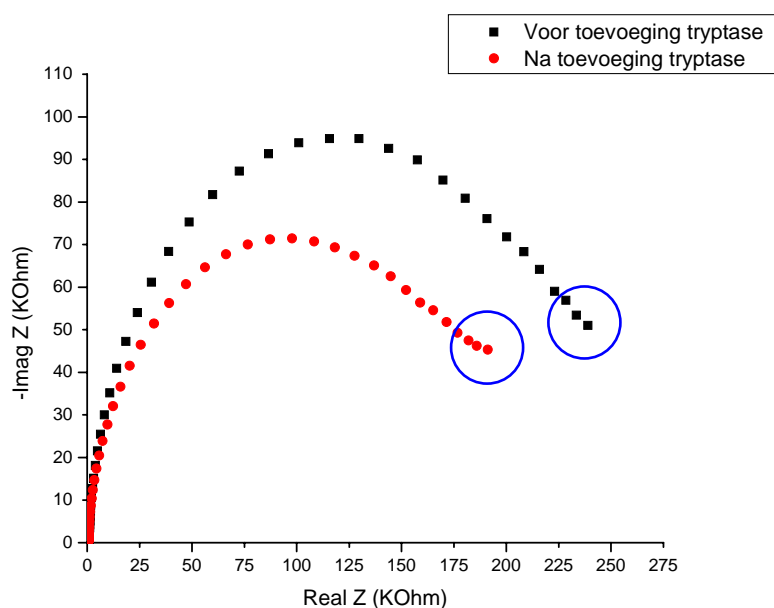
In Figuur 47 staat de Bode plot van het Ab-tryptase 1 kanaal. Net zoals het OC₁C₁₀-PPV kanaal is er een initieel capacitief verloop van de impedantie. De fasehoek is circa 35° kleiner dan het OC₁C₁₀-PPV kanaal. Na tryptase toevoeging is er een grote impedantie daling over heel het frequentie spectrum. De impedantie heeft na toevoeging van tryptase nog altijd een capacitief verloop. Wat ook opvalt, is de fasehoek verandering na tryptase toevoeging. Na toevoeging is de fasehoek circa 25° gedaald, wat wijst op een meer capacitief verloop aangezien de hoek richting de -90° verandert.

De Bode plot van het Ab-tryptase 2 kanaal (Figuur 48) is analoog aan die van het Ab-tryptase 1 kanaal, alleen minder uitgesproken. Er is een initieel capacitief verloop van de impedantie. Ook hier is de fasehoek circa 35° kleiner dan het OC₁C₁₀-PPV kanaal. Na tryptase toevoeging is in het lage en middel frequentie gebied een impedantie verandering waar te nemen maar niet zo groot als Ab-tryptase 1, eerder de grootte van de impedantie verandering van het OC₁C₁₀-PPV kanaal. Het verschil tussen het Ab-tryptase 2 en OC₁C₁₀-PPV kanaal ligt in het feit dat bij het Ab-tryptase 2 kanaal de fasehoek circa 8° daalt, terwijl die bij het OC₁C₁₀-PPV kanaal stabiel blijft.

Er is dus een verschil tussen de wijze waarop de 2 Ab-tryptase kanalen dalen in impedantie in vergelijking met het OC₁C₁₀-PPV kanaal. Bij de Ab-tryptase kanalen is er een duidelijke fasehoek verandering die niet aanwezig is bij het OC₁C₁₀-PPV kanaal.

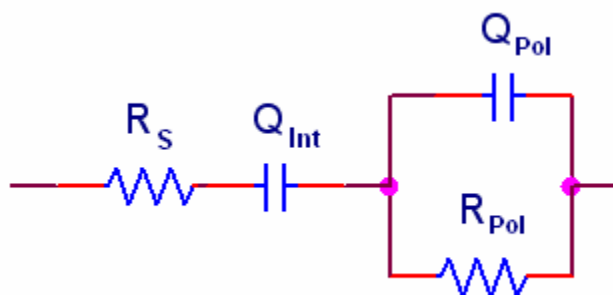
Nyquist plot

Met behulp van een Nyquist plot is het mogelijk om een equivalent circuit te fitten in de gemeten data. Hierdoor kan er gekeken worden welke componenten aanwezig zijn en welke componenten wijzigen bij toevoeging van de analiet. Elke Nyquist plot, voor en na toevoeging van tryptase wordt met behulp van ZsimpWin gefit in een equivalent circuit.



Figuur 49: Nyquist plot OC₁C₁₀-PPV voor en na toevoeging tryptase.

In Figuur 49 staat de Nyquist plot voor en na toevoeging van tryptase. Om te zien welke componenten veranderen, wordt deze data gefit met het equivalente circuit uit Figuur 50. R_S is de weerstand van de solutie, Q_{Int} is dubbellaag die niet gerelateerd is aan de polymeer, R_{Pol} is de weerstand van polymeer en Q_{Pol} is de capaciteit van het polymeer. De chi-kwadraat waarde (een indicator van hoe goed een fit is) van voor en na de toevoeging is respectievelijk $3.58E-03$ en $5.62E-03$ wat relatief een goede fit is omdat de data die gefit wordt maar over een klein frequentiegebied loopt, namelijk van 10^2 naar 10^6 Hz. De overeenkomstige waardes staan weergegeven in Tabel 4.

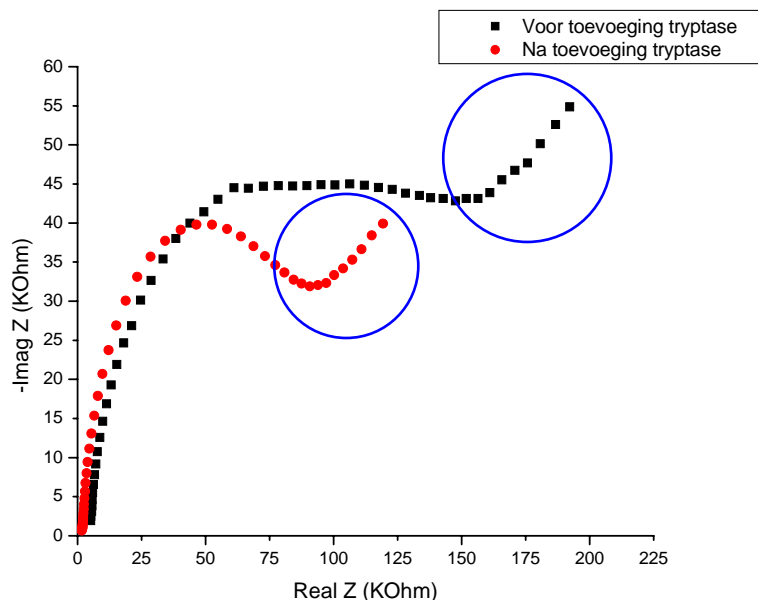


Figuur 50: Equivalent circuit RQ(RQ).

Tabel 4: Equivalent circuit en bijhorende waarden voor OC₁C₁₀ kanaal

Circuit: RQ(QR)							
	R _S (Ohm)	Q _{Int} ((S/cm).s ⁿ)	n	R _{Pol} (Ohm)	Q _{Pol} ((S/cm).s ⁿ)	n	Chi kwadraat
Voor	967	9.64E-08	0.8281	2.08E+05	8.28E-10	0.9543	3.58E-03
Na	669.2	1.11E-07	0.8029	1.59E+04	1.03E-09	0.9399	5.62E-03
Vershil (%)	-30.8	15.3	-3.0	-92.3	24.2	-1.5	

In Tabel 4 zijn de grootste veranderingen gerelateerd aan aspecifieke binding van tryptase aan het oppervlak van OC₁C₁₀-PPV, zoals te zien is aan de stijging van Q_{Int} en Q_{Pol} en aan de daling van R_{Pol}. R_S daalt omdat de tryptase die wordt toegevoegd aan de sensor, in een buffer zit waar Natrium en Chloor ionen aanwezig zijn. Door het introduceren van deze ionen aan de solutie, vindt er een weerstandsdaling plaats. In Figuur 49 is na de toevoeging van tryptase, de Q_{Int} duidelijker dan voor de toevoeging van tryptase (blauwe cirkel). De (R_{Pol} Q_{Pol}) is ook gedaald na de toevoeging van tryptase, net zoals de R_S. In Figuur 51 staat de Nyquist plot van het Ab-tryptase 1 kanaal. Ook deze wordt gefit met het equivalente circuit uit Figuur 50. De waardes die uit de fit komen, kunnen teruggevonden worden in Tabel 5.



Figuur 51: Nyquist plot Ab-tryptase 1 kanaal voor en na toevoeging van tryptase.

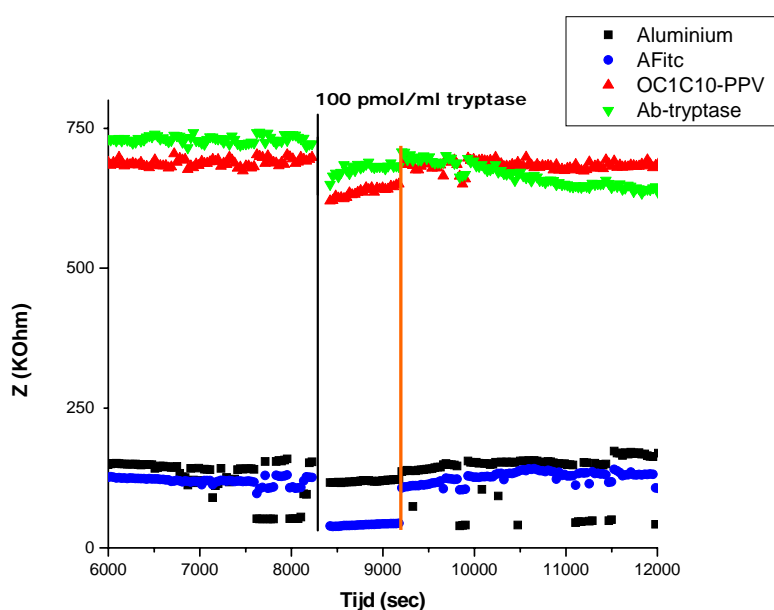
Tabel 5: Equivalent circuit en bijhorende waarden voor Ab-tryptase 1 kanaal

Circuit: RQ(QR)							
	R_S (Ohm)	Q_{Int} ((S/cm).s ⁿ)	n	R_{Pol} (Ohm)	Q_{Pol} ((S/cm).s ⁿ)	n	Chi kwadraat
Voor	3667	3.64E-07	0.519	1.15E+05	1.05E-09	0.8216	6.07E-03
Na	1448	4.93E-07	0.5544	7.56E+04	1.03E-09	0.9567	1.35E-03
Vershil (%)	-60.5	35.5	6.8	-34.1	-2.3	16.4	

Ook hier daalt R_S na toevoeging van tryptase, de reden hiervoor is dezelfde als voor het OC₁C₁₀-PPV kanaal. De Q_{Int} heeft ook een stijging maar deze is 25,2% groter dan het OC₁C₁₀-PPV kanaal. Dit kan toegeschreven worden aan de specifieke binding van tryptase aan de antilichamen. Dat er antilichamen aanwezig zijn, is duidelijk aan de n-waarde die circa 0,3 kleiner is als de n-waarde van Q_{Int} bij het OC₁C₁₀-PPV kanaal, hoe ruwer het oppervlak hoe kleiner de n-waarde van een constant phase element gaat zijn. Dit is zichtbaar in Figuur 51 waar de Q_{Int} sterker aanwezig is (blauwe cirkels). Aangezien er al antilichamen aan het oppervlak van het AB-tryptase 1 kanaal aanwezig zijn, heeft tryptase minder de kans om aspecifiek te binden aan de OC₁C₁₀-PPV transducerlaag. Dit blijkt uit de R_{Pol} en Q_{Pol} waarde die respectievelijk minder sterk daalt en relatief gelijk blijft.

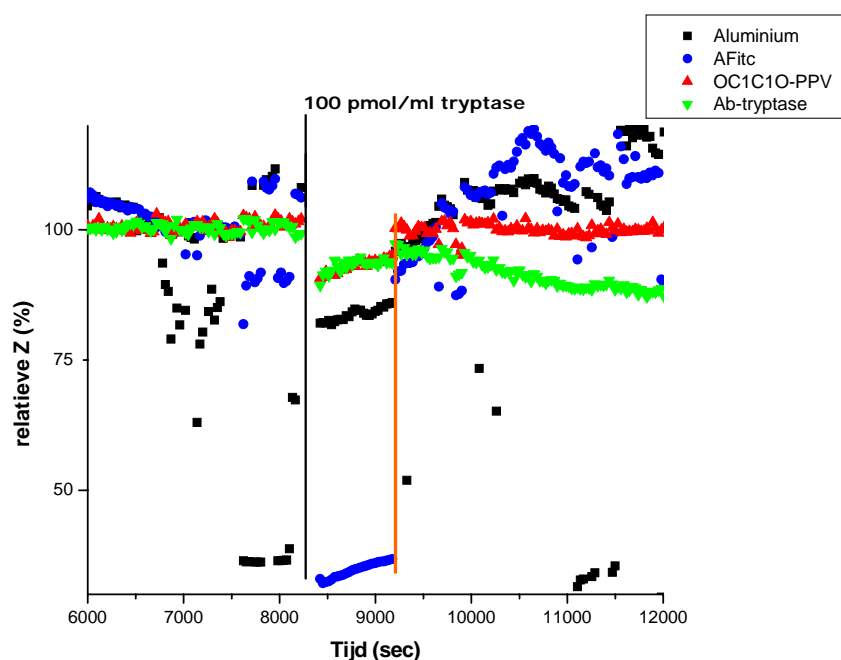
3.3.3 Al interdigitale elektroden

Meting 2 gebeurt met Al interdigitale elektroden. Kanaal 1 is een Al elektrode, kanaal 2 is bedekt met Antilichamen tegen Fitc (100 pmol/ml), kanaal 3 is OC₁C₁₀-PPV en kanaal 4 is bedekt met antilichamen tegen tryptase (100 pmol/ml). Ook bij deze meting wordt er eerst gestabiliseerd met PBS, eens gestabiliseerd wordt er 100 pmol/ml tryptase toegevoegd aan de statische vloeistofcel (Figuur 52).



Figuur 52: meting 2 (Al, Ab-Fitc, OC₁C₁₀-PPV en Ab-tryptase), Z in functie van de tijd bij toevoeging 100 pmol/ml tryptase.

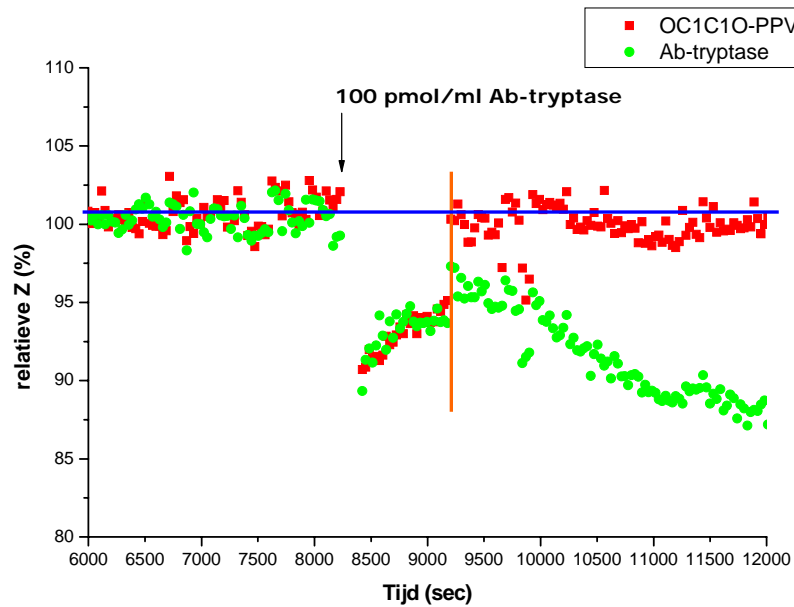
Het eerste wat opvalt in Figuur 52 is de lage impedantie voor het Ab-Fitc kanaal, dit ligt in de buurt van het Al kanaal. Het is niet logisch dat het Al kanaal en Ab-Fitc kanaal een evenwaardige impedantie hebben aangezien het Ab-Fitc kanaal nog een transducerlaag en antilichaam laag bevat. Normaal zou het Ab-Fitc kanaal een impedantie gelijkaardig aan die van het OC₁C₁₀-PPV kanaal en Ab-tryptase kanaal hebben. Het tweede wat opvalt, is dat na toevoeging van tryptase de impedantie voor alle kanalen daalt en na een periode van circa 850 sec zonder enige actie terug verspringt (oranje lijn). Dit wijst meer op een verstoring van het meetsysteem dan een effect van de tryptase omdat het voor alle kanalen op hetzelfde moment gebeurt. Het kan zijn dat bij toevoeging van de tryptase er luchtballen zijn achtergebleven die de meting hebben verstoord. Als de data via vgl. 7 relatief wordt gemaakt (Figuur 53), blijkt dat zowel het Al als het Ab-Fitc kanaal niet stabiel zijn bij de toevoeging van de tryptase. Dit maakt het onmogelijk om de effecten van tryptase op deze 2 kanalen te bekijken. Om deze reden worden deze twee kanalen niet verder bekeken. In Figuur 54 worden de 2 overgebleven kanalen (OC₁C₁₀-PPV en Ab-tryptase) verder bekeken.



Figuur 53: Meting 2 (Al, Ab-Fitc, OC₁C₁₀-PPV en Ab-tryptase), relatieve z in functie van de tijd bij toevoeging van 100 pmol/ml tryptase.

Voor de tryptase toevoeging zijn beide kanalen gestabiliseerd en hebben een gelijke impedantie. Na toevoeging van 100 pmol/ml tryptase is er de verstoring van de sensor waardoor voor beide kanalen de impedantie daalt. Bij deze verstoring hebben de kanalen gelijke impedantie en stijgen licht. Nadat de verstoring weg is (oranje lijn) is, verschilt de impedantie tussen de kanalen. Het OC₁C₁₀-PPV kanaal heeft na de verstoring dezelfde impedantie als voor de voorstoring (blauwe lijn). De toevoeging van de tryptase heeft dus geen invloed gehad op dit kanaal. Het Ab-tryptase kanaal heeft na de verstoring een

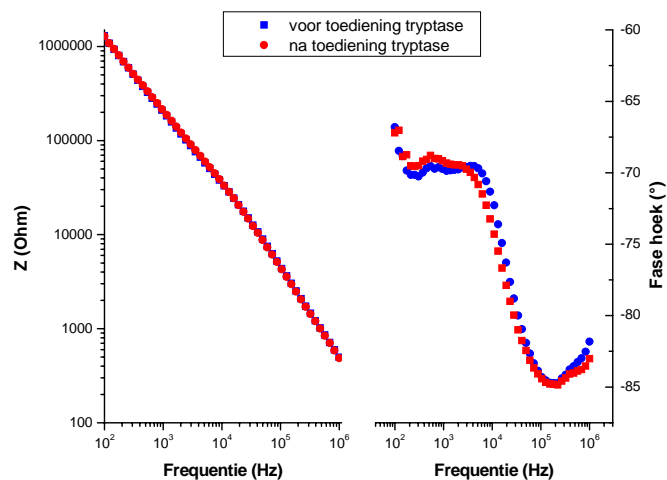
impedantie daling van circa 5% ten opzichte van voor de toevoeging van 100 pmol/ml tryptase. De impedantie blijft dalen tot het begint af te vlakken en het kanaal opnieuw gestabiliseerd is. Op dit punt is er een impedantiedaling van circa 12% ten opzichte van voor de toevoeging van 100 pmol/ml tryptase.



Figuur 54: Meting 2 (OC₁C₁₀-PPV en Ab-tryptase), relatieve Z in functie van de tijd bij toevoeging 100 pmol/ml tryptase.

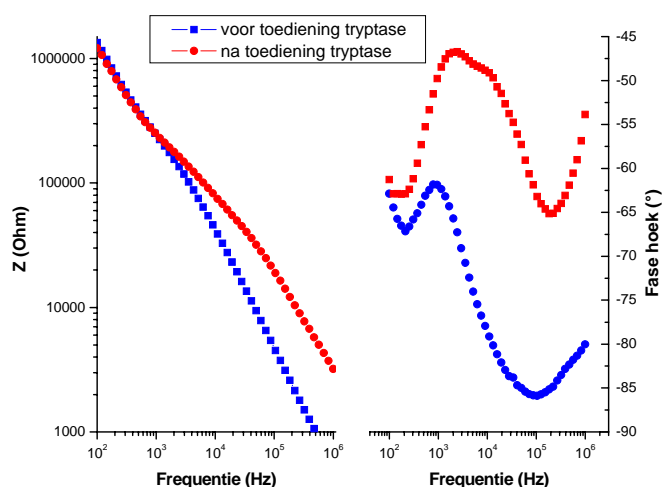
Bode plot

In de Bode plot van het OC₁C₁₀-PPV kanaal (Figuur 55) is er geen verschil in impedantie over heel het frequentiespectrum voor en na de toediening van tryptase. De fasehoek is lichtjes veranderd doordat deze naar links is verschoven maar de laagste fasehoek die bereikt wordt in het spectrum verschilt niet met de fasehoek van voor de toediening.



Figuur 55: Bode plot OC₁C₁₀-PPV kanaal.

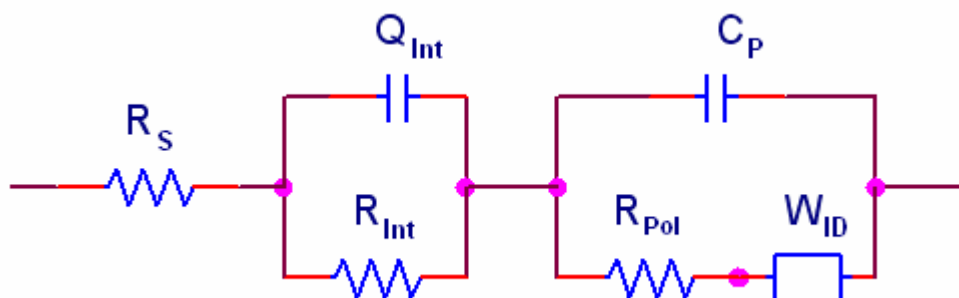
In de Bode plot van het Ab-tryptase kanaal (Figuur 56) is er wel een verschil tussen de impedantie voor en na de toediening. Dit verschil is het meest uitgesproken in de hogere frequentie regio's maar het verschil is ook licht aanwezig in het gebied van de lage frequenties. De fasehoek is over heel het frequentiespectrum drastisch omhoog gegaan, ook de vorm van de curve is veranderd. Waar de fasehoek voor de toevoeging netto gezien over heel een spectrum een daling heeft, is er na de toevoeging geen netto daling maar blijft op dezelfde hoogte. Er is na de toevoeging een piek in het middenfrequentiegebied. De fasehoek stijging bij de interdigitale elektrodes is het omgekeerde van bij de coplanaire elektroden waar er een fasehoek daling is na toevoeging van tryptase. Om een beter idee te hebben van de veranderingen in de sensor wordt er naar de Nyquist plots gekeken.



Figuur 56: Bode plot Ab-tryptase kanaal.

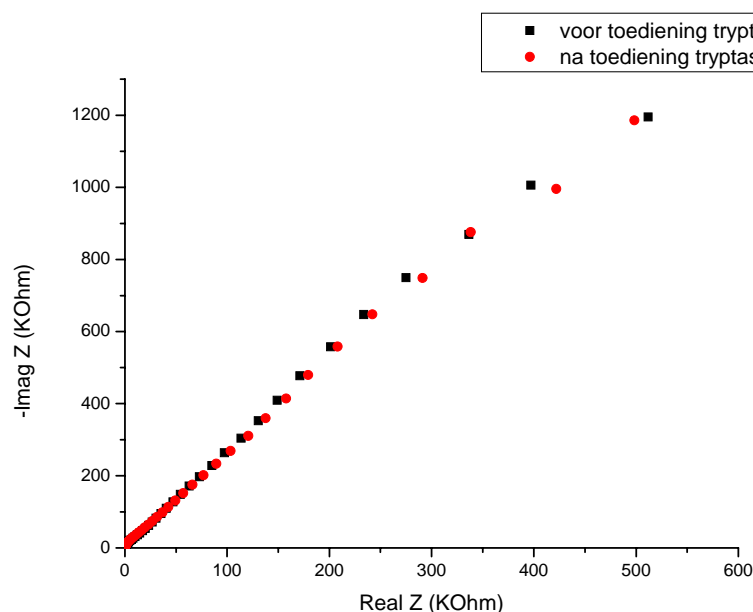
Nyquist plots

Er is nog niet veel geweten over de nieuwe IDE's, wat het fitten van een juist equivalent circuit moeilijker maakt. Dit is een van de eerste metingen met deze soort elektrodes en na meerdere fitpogingen is er geen eenduidig circuit uit de bus gekomen. Zo paste het vooropgestelde equivalente circuit voor coplanaire elektroden uit Figuur 50 niet met het OC₁C₁₀-PPV kanaal bij de interdigitale elektroden. Voor dit kanaal werd er een uitgebreider equivalent circuit gevonden (Figuur 57). De extra componenten zijn een weerstand voor de dubbellaag van de interface (R_{Int}) en een Warburg die instaat voor ion diffusie (W_{ID}).



Figuur 57: Equivalent circuit R(QR)(C(RW)).

De waarden van het gefitte OC₁C₁₀-PPV kanaal (Figuur 58) zijn terug te vinden in Tabel 6.



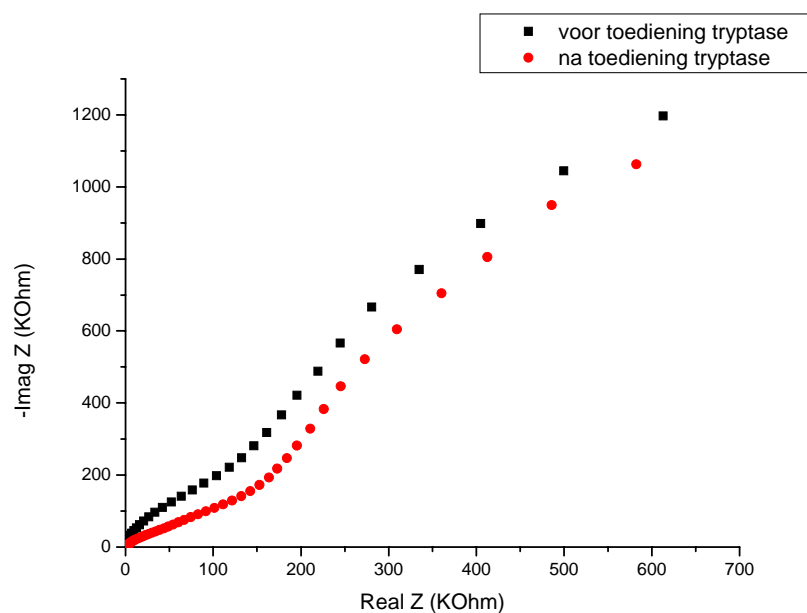
Figuur 58: Nyquist plot OC₁C₁₀-PPV kanaal voor en na toevoeging van tryptase.

Tabel 6: Equivalent circuit en bijhorende waarden voor OC₁C₁₀-PPV kanaal

R(QR)(C(RW))								
	R _s (Ohm)	Q _{Int} ((S/cm).s ⁿ)	n	R _{Int} (Ohm)	C _p (F)	R _{ct} (Ohm)	W _{ID} (Ω.s ^{-1/2})	Chi kwadraat
Voor	37.58	1.83E-09	0.9281	3.10E+04	6.88E-10	4.29E+04	1.82E-08	6.53E-04
Na	22.79	2.21E-09	0.9172	3.75E+04	6.88E-10	4.47E+04	1.81E-08	4.93E-04
Vershil (%)	-39.4	20.7	-1.2	21.0	0	4.1	-0.2	

Op het eerste zicht zijn er geen grote veranderingen gebeurd. Een daling van de solutie weerstand, die net zoals bij de coplanaire elektroden toegeschreven kan worden aan de additie van extra ionen van de buffer waarin de tryptase zit. Wat nog opvalt aan de waarden van R_s is dat ze lager liggen dan bij de coplanaire elektroden. Dit is een effect van de interdigitale elektroden die minder in de solutie meten. Er is ook een stijging van de capaciteit van de interface laag. Deze stijging is te danken aan aspecifieke binding van tryptase aan de OC₁C₁₀-PPV transducerlaag. Deze aspecifieke binding blijkt ook uit de stijging van de weerstand van R_{Int} omdat tryptase niet geladen is en dus de elektrische flow gaat storen. Voor de rest blijven de waarden stabiel voor en na de toevoeging van tryptase.

Voor het Ab-tryptase kanaal (Figuur 59) blijkt het circuit uit Figuur 50 een goed fit te zijn (Tabel 7).



Figuur 59: Nyquist plot Ab-tryptase kanaal voor en na toevoeging van tryptase.

Tabel 7: Equivalent circuit and corresponding values for Ab-tryptase channel

Circuit: RQ(QR)							
	R_s (Ohm)	Q_{Int} ((S/cm).s ⁿ)	n	R_{Pol} (Ohm)	Q_{Pol} ((S/cm).s ⁿ)	n	Chi kwadraat
Voor	29.05	2.45E-09	0.8954	1.29E+05	7.53E-10	1	3.99E-03
Na	885.2	7.82E-09	0.7427	7.90E+04	1.31E-09	0.8204	2.58E-03
Vershil (%)	2947.2	219.3	-17.1	-38.9	73.8	-18.0	

Er is een stijging van de capaciteit van de interface (Q_{Int}) van 219.3% wat 192% meer is als het OC₁C₁₀-PPV kanaal. Dit wijst op specifieke binding van de tryptase aan de geïncubeerde antilichamen. Dit blijkt ook uit de daling van de n-waarde van Q_{Int} , wat wijst op een ruwer worden van het oppervlak. De capaciteit van het OC₁C₁₀-PPV polymeer stijgt met 73,8% wat op aspecifieke binding van tryptase kan wijzen, dit blijkt ook uit de daling van de n-waarde. De meest werkwaardige verandering is de grote stijging van de solutie weerstand. Deze interdigitale elektroden meten maar voor een klein deel in de solutie, mocht dit klein deel net boven de antilichamen komen, zal door binding van tryptase de hoeveelheid ionen verminderen in de buurt van de antichamen omdat hun plaats wordt ingenomen door de tryptase.

3.3.4 Algemeen besluit

Via een impedantie meting is succesvol de fysieke adsorptie van antilichamen gemeten aan de OC₁C₁₀-PPV transducerlaag. Er is aangetoond dat met behulp van immunosensoren tryptase impedimetrisch gedetecteerd kan worden. Bij beide metingen is er een netto impedantiedaling van meer dan 10%. De Interdigitale elektroden zijn gevoeliger voor veranderingen aan de oppervlakte in vergelijking met de coplanaire elektroden. Voor de coplanaire elektroden is er een equivalent circuit gevonden waar de binding van tryptase uit afgeleid kan worden. Het definitieve equivalente circuit voor de interdigitale elektroden staat nog niet vast, dit blijkt uit de nood van meerdere equivalente circuits voor meerdere kanalen. Toch is uit de fits de binding van tryptase af te leiden. Voor de coplanaire elektroden is er een Q_{int} stijging van 35.2% terwijl er voor de interdigitale elektroden een stijging van 219.3% is na toevoeging van dezelfde hoeveelheid tryptase op dezelfde hoeveelheid geïncubeerde antilichamen. Om een beter beeld te krijgen van het gewenste circuit voor de interdigitale elektroden is er nood aan meerdere metingen zodoende dat er meerdere datasets zijn om mee te fitten.

4 Conclusie

TiN elektroden voor de immunosensoren zijn succesvol aangemaakt met de etstechniek, wat dus een alternatief kan zijn voor het standaard sputteren van elektroden. De techniek heeft nog variabele resultaten maar verder uitwerken van het protocol zou dit kunnen verhelpen. De sputtertechniek heeft toch nog de voorkeur omdat deze minder arbeidsintensief is.

Incubatie van de antilichamen aan de OC₁C₁₀-PPV laag is een techniek waarmee de antilichamen fysiek geadsorbeerd worden. De adsorptie is effectief en een volledig bedekt oppervlak wordt bereikt met een concentratie van 100 pmol/ml. Dit wordt bevestigd door zowel de contacthoekmetingen waar er verzadiging van het oppervlak optreedt bij 100 pmol/ml antilichamen als bij de AFM metingen waar een concentratie van 80 pmol/ml antilichamen een verzadigde laag vormt op het OC₁C₁₀-PPV. De fysieke adsorptie is ook aangetoond via een impedimetrische meting waar een impedantie daling zichtbaar is binnen het vooropgestelde uur van incuberen. Op lange termijn is het aangewezen om antilichamen covalent te linken omdat dit een stevigere binding is dan de van der Waals krachten.

Een detectie van tryptase is gemeten zowel bij coplanaire TiN elektroden als bij nieuwe Al interdigitale elektroden. Het Ab-tryptase kanaal van de coplanaire elektroden heeft een daling van 38% terwijl het OC₁C₁₀-PPV kanaal een daling van 20% heeft, dit komt neer op een netto daling van 18% voor het Ab-tryptase kanaal. Het Ab-tryptase kanaal van de Al interdigitale elektrode heeft een netto daling van 12%. De coplanaire elektroden worden gefit met een RQ(RQ) equivalent circuit. Hieruit kunnen de verschillen tussen het Ab-tryptase en OC₁C₁₀-PPV kanaal gehaald worden. De belangrijkste verandering vindt plaats aan de capaciteit van de interface. Tussen de twee kanalen is er een significant verschil in de stijging van de Q_{Int} na toevoeging van tryptase. De Q_{Int} van de Ab-tryptase elektrode (35.5%) stijgt meer dan die van de OC₁C₁₀-PPV elektrode (15.2%). Ook voor de interdigitale elektroden is er gepoogd om een equivalent circuit te fitten maar dit blijkt niet zo evident en er is geen eenduidig circuit voor gevonden wat voor alle kanalen tegelijk toepasbaar is. De Ab-tryptase elektrode wordt net zoals bij de coplanaire elektroden gefit met een RQ(RQ) circuit terwijl de OC₁C₁₀-PPV elektrode gefit wordt met een R(RQ)(C(RW)) circuit. Net zoals bij de coplanaire elektroden is er na toevoeging van tryptase een significant verschil in de stijging van de Q_{Int} tussen het Ab-tryptase kanaal en het OC₁C₁₀-PPV kanaal na toevoeging van tryptase. De capaciteit stijging van de OC₁C₁₀-PPV elektrode bedraagt 20.7% en de capaciteit stijging van de Ab-tryptase elektrode bedraagt 219.2%. De grotere stijging van Q_{Int} bij de Ab-tryptase elektroden is toe te schrijven aan specifieke hechting van tryptase aan de antilichamen terwijl de kleine stijging van Q_{Int} bij de OC₁C₁₀-PPV elektroden te wijten is aan aspecifieke hechting van tryptase. Het verschil in Q_{Int} stijging tussen de Ab-tryptase kanalen komt door de aard van de elektroden. De interdigitale elektroden meten minder in de solutie en zijn dus sensitiever dan de coplanaire elektroden. Het grootste probleem van de immunosensor op dit moment is de stabiliteit en reproduceerbaarheid. De elektroden van de sensor kunnen niet werken door loskomen van wirebonds, loskomen van de transducerlaag of andere neveneffecten.

5 Referenties

- [1] Cooreman P, Thoelen R, Manca J, vandeVen M, Vermeeren V, Michiels L, et al. *Impedimetric immunosensors based on the conjugated polymer PPV*. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005; 20 (10): 2151 – 2156.
- [2] P. Melidis. *Biosensor for toxic detection and process control in nitrification plants*. *Journal of Environmental Engineering*. 2005; 131 (4): 658-663.
- [3] URL:http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dorlands.jspzQzpgzEzzSzppdocszSzuszSzcommonzSzdorlandzSzdorlandzSzdmd_s_08zPzhtm
- [4] Cunningham AJ. *Biosensors and bioanalytical challenges*. *Introduction to bioanalytical sensors*, New York: John Wiley & Sons; 1998. p. 10 – 11.
- [5] Gerard M, Chaubey A, Malhotra BD. *Application of conducting polymers to biosensors*. *Biosensors & Bioelectronics*. 2002; 17 (5): 345 – 359.
- [6] Eggins B. Introduction. *Biosensors an introduction*, Chichester: John Wiley & Sons; 1996. p 2 – 3.
- [7] Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Müller-Lissner SA. *Functional bowel disorders and functional abdominal pain*. *Gut*. 1999; 45 (2): 1143 – 1147.
- [8] Camilleri M, Choi MG. review article: *Irritable bowel syndrome*. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997; 11 (1): 3 – 15.
- [9] Sandler RS. *Epidemiology of irritable bowel syndrome in the United States*. *Gastroenterolgy*. 1990; 99 (2): 409 – 415.
- [10] Talley NJ. *Irritable bowel syndrome: definition, diagnosis and epidemiology*. *Baillière's Clinical Gastroenterology*. 1999; 13 (3): p. 371 – 384.
- [11] Smout AJPM. *Prikkelbare darm syndroom*. 4^{de} editie Wormer: Inmerc bv; 2001. p. 23 – 28.
- [12] Drossman DA. Review article: *an integrated approach to the irritable bowel syndrome*. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; 13 (2): 3 – 14.
- [13] Drossman DA, Whitehead WE, Camilleri M. *Irritable bowel syndrome: a technical review for practice guideline development*. *Gastroenterology* 1997; 112 (6): 2120 – 2137.
- [14] Wood JD, Alpers DH, Andrews PLR. *Fundamentals of neurogastroenterology*. *Gut*. 1999; 45 (II): II6 – II16.
- [15] Drossman DA, the functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. In Drossman DA, Corazziari E, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, eds. *Rome II: the functional Gastrointestinal disorders: diagnosis, Pathophysiology, and Treatment: A multinational consensus*. 2nd ed. McLean, VA Degnon Associates; 2000: 1 – 29.
- [16] Gershon MD. *Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel*. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; 13 (2): 15 – 30.
- [17] Prior A, Read NW. *Reduction of rectal sensitivity and post-prandial motility by granisetron, a 5-HT-receptor antagonist, in patients with Irritable bowel syndrome*. *Aliment Pharmacol Ther*. 1993; 7 (2): 175 – 180.

- [18] Gershon MD. *5-HT (serotonin) physiology and related drugs*. *Curr op Gastroenterol*. 2000; 16 (2): 113 – 120.
- [19] O’Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, et al. *Increased mast cells in the irritable bowel syndrome*. *Neurogastroenterol. Mot*. 2000; 12 (5): 449 – 457.
- [20] Weston A, Biddle W, Bhatia P, Miner P. *Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome*. *Dig Dis Sci*. 1993; 38 (9); 1590 – 5.
- [21] Barbara G, Cottrell G, Cremon C, Guerrini S, De Giorgio R, Andrade-Gorden P, et al. *Protease-activated receptor (PAR-2) and mast cell tryptase in irritable bowel syndrome*. *Digestive and Liver Disease*. 2002; 34 (1); A100
- [22] Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolin M, Cadahia A, et al. *Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans*. *Gastroenterology*. 1998; 114 (4); 640 – 648.
- [23] Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell S, Santini D, et al. *Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome*. *Gastroenterology*. 2004 (3); 126; 693 – 702.
- [24] Payne V, Cam PCA. *Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance*. *Anaesthesia*. 2004; 59 (7); 695 – 703.
- [25] URL: <http://160.114.99.91/astrojan/protein/pictures/triptaza.jpg>
- [26] Hallgren J, Pejler G. *Biology of mast cell tryptase, an inflammatory mediator*. *FEBS journal*. 2006; 273 (9); 1871 – 1895.
- [27] URL:<http://www.biology.arizona.edu/IMMUNOLOGY/tutorials/antibody/graphics/antibody.gif>
- [28] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 4^{de} editie New York: Garland science; 2002. p. 1363 – 1421.
- [29] Nairn R, Helbert M. *Immunology for medical students*. Edinburgh: Mosby; 2002. p. 31 - 37
- [30] Nairn R, Helbert M. *Immunology for medical students*. Edinburgh: Mosby; 2002. p. 23 – 30.
- [31] Thoelen R, Vansweevelt R, Duchateau J, Horemans F, D’Haen J, Lutsen L, et al. *A MIP-based impedimetric sensor for detection of low-MW molecules*. *Biosensors & Bioelectronics*: 2007; p 1 – 5 submitted.
- [32] Hoorcollege Patrick Wagner. *Elektrochemische en elektronische biosensoren*. Sputteren=koudkathoden-verstuiving van metallisatielagen: 15 - 16.
- [33] Laureyn W, Nelis D, Van Gerwin P, Baert K, Hermans L, Magnée R et al. *Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing*. *Sensors and Actuators*. 2000; B68 (3): p. 360 – 370.
- [34] URL: <http://www.cise.columbia.edu/clean/process/spintheory.pdf>
- [35] URL: <http://www.xmission.com/~ralcon/tutorial/images/tutorial/spincoat.gif>
- [36] URL: <http://www.iupac.org/goldbook/P04667.pdf>
- [37] URL: <http://www.iupac.org/goldbook/V06597.pdf>
- [38] URL: <http://francis.courtois.free.fr/jc1/serial/Cases/Dektak.html>

- [39] Exl F, Kindersberger J. *Contact angle measurement on insulator surfaces with artificial pollution layer and various surface roughnesses*. Proceedings of the XIVth International Symposium on High Voltage Engineering. 2005; D47; 1 -5.
- [40] Hafner JH, Cheung CL, Woolley AT, Lieber CM. *Review: Structural and functional imaging with carbon nanotube AFM probes*. Progress in Biophysics & Molecular Biology. 2001; 77 (1); 73 – 110.
- [41] Alonso JL, Wolfgang H, Goldmann. *Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology*. Life sciences. 2003; 72 (23); 2553 – 2560.
- [42] URL: <http://barrett-group.mcgill.ca/teaching/nanotechnology/afm.jpg>
- [43] URL: <http://www.spmtips.com/products/cantilevers/catalog/noncontact>
- [44] URL: http://www.gamry.com/App_Notes/EIS_Primer/EIS_Primer.htm
- [45] URL: <http://www.consultrsr.com/resources/eis/cpe1.htm>
- [46] URL: <http://www.consultrsr.com/resources/eis/diffusion.htm>

6 Bijlage

Poster die tweede prijs behaalde op de 'joint meeting of the Belgian Physical Society and the Belgian Biophysical Society'.

Development of a Biosensor for the Detection of Histamine and Tryptase

E. Bongaers¹⁾, L. Grieten¹⁾, J. Alenus¹⁾, P. Wagner¹⁾, F. Troost²⁾ and R.-J. Brummer²⁾

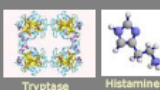
1) Institute for Materials Research, Hasselt University, Wetenschapspark 1, 3590 Diepenbeek, Belgium
2) Gastroenterology & Hepatology, dept. of Internal Medicine, Nutrition and Toxicology Research Institute Maastricht (NUTRIM), Maastricht University, Universiteitssingel 50, 6229 ER Maastricht, The Netherlands

Introduction

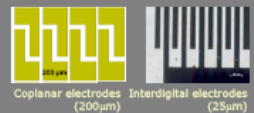
In the Irritable Bowel Syndrome (IBS) an emotional event causes great physical discomfort for patients. There is ample evidence that mast cells are triggered to release liquids containing histamine, tryptase and other compounds, causing a chainreaction. To verify the effectiveness of current therapies *in vivo* measurements need to be performed on the mucous membrane of the small intestine. The limited accessibility of the intestines however makes it difficult to measure this intestinal mast cell activation *in vivo*. Therefore an impedimetric immunosensor for the detection of histamine and tryptase *in vivo* is under development. For the low-molecular weight antigen histamine interdigital electrodes (IDE's) are used to increase sensitivity.

Materials & Methods

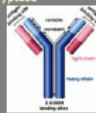

- **Materials:**
 - Antigens: Tryptase (135 kDa) & histamine (111 Da)
 - Antibodies IgG for tryptase and histamine.
- **Sensor setup**
 - Electrode material: - 50 nm TiN coplanar electrodes for tryptase
- 100 nm Al interdigital electrodes (IDE) for histamine
 - Coated with 100nm MDMO-PPV, a semiconducting polymer.
 - Antibodies are immobilised using physical adsorption (1h @ 37°C).
A 100pmol/ml solution is used for biosensor samples.
- **Electrochemical Impedance Spectroscopy**
 - Impedance is measured as function of frequency from 100 Hz to 1 MHz.
 - An addition set-up is used at room temperature.



Tryptase Histamine

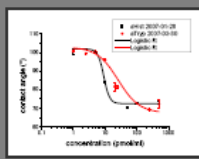


Coplanar electrodes (200µm) Interdigital electrodes (25µm)

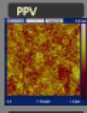
Characterisation

- **Contact angle**
 - PPV surface is hydrophobic (>90°).
 - Incubating antibodies on PPV renders the film hydrophilic (<90°).
 - This indicates the successful adsorption of Ab to polymer, according to the Wronan effect.
 - From the logistic fits we conclude that at a concentration of 100pmol/ml the Ab adsorption is saturated.

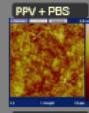


Legend:
■ anti-200nm-PPV
■ anti-200nm-PPV-antibody
■ anti-25µm-IDE
■ anti-25µm-IDE-antibody

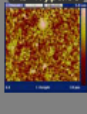
- **AFM**
 - Incubation with PBS causes little swelling of the polymer. With AFM the receptor molecules can be visualised. The yellow structures are clusters of antibodies.
 - It can be seen that using physical adsorption the antibodies for histamine and tryptase are successfully immobilised on a polymer surface.



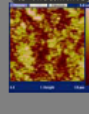
PPV



PPV + PBS



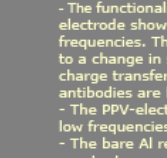
Ab-Tryptase



Ab-Histamine

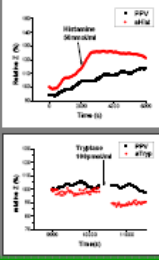
Biosensing

- **Impedance Spectroscopy**
 - Bodeplots before and after the addition of 50nmol/ml histamine are compared. The difference in amplitude signal is plotted for 3 electrodes (Al/PPV/ PPV functionalised with anti-histamine):
 - The functionalised anti-histamine electrode shows a change in Z at low frequencies. This sensing effect is due to a change in surface capacity and charge transfer resistance when the antibodies are bound to their antigen.
 - The PPV-electrode shows a change at low frequencies due to drift.
 - The bare Al reference electrode stays constant.



Legend:
■ Al
■ PPV
■ anti-PPV

- **Time-resolved Impedance Spectroscopy**
 - At low frequencies (212kHz):
 - **Histamine**
 - IDE with anti-histamine shows 10% change in Z - apart from the signal drift, the polymer reference IDE remains constant after addition of histamine.
 - **Tryptase**
 - Electrode with anti-tryptase shows 10% change in Z
 - polymer reference electrode remains constant







Legend:
■ PPV
■ anti-PPV

Conclusion

Antibodies for histamine & tryptase were successfully immobilised on polymer-based electrodes. Upon detecting tryptase the immunosensor shows an impedimetric response of 10% at low frequencies. IDE's make it possible to detect smaller molecules. By using IDE's it was possible to detect the low-molecular weight histamine. Although a high concentration is required for the 10% increase in sensor signal, we were able to use a direct assay for the detection of such small molecules. IDE's are proven to be beneficial for use in both future histamine and tryptase experiments.

Acknowledgements

This research is funded by the School for Life Sciences, part of the transnational University Limburg. The authors would like to thank IMEC, R. Thoelen and W. Moons for supplying IDE's and L. Michiels for his help and advice.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

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

Impedimetrische herkenning van tryptase met behulp van immunosensoren.

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

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.

Ik ga akkoord,

Jan Alenus

Datum: **19.06.2007**