

TRANSPORT PHENOMENA IN NANOFUIDICS: FROM IONIC STUDIES TO PROTEOMIC APPLICATIONS

THÈSE N° 3538 (2006)

PRÉSENTÉE LE 9 JUIN 2006

À LA FACULTÉ SCIENCES ET TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR
Laboratoire de microsystèmes 4
SECTION DE MICROTECHNIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Reto Bruno SCHOCH

Dipl. Masch.- Ing. ETH
de nationalité suisse et originaire de Fischenthal (ZH)

acceptée sur proposition du jury:

Prof. Y. Leblebici, président du jury
Prof. Ph. Renaud, directeur de thèse
Prof. H. Girault, rapporteur
Prof. J. Han, rapporteur
Prof. A. van den Berg, rapporteur



ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

Lausanne, EPFL
2006

ABSTRACT

This thesis explores transport phenomena in nanochannels on a chip. Fundamental nanofluidic ionic studies form the basis for novel separation and preconcentration applications for proteomic purposes.

The measurements were performed with 50-nm-high 1D nanochannels, which are easily accessible from both sides by two microchannels. Nanometer characteristic apertures were manufactured in the bonded structure of Pyrex-amorphous silicon – Pyrex, in which the thickness of the amorphous silicon layer serves as a spacer to define the height of the nanochannels. The geometry of the nanometer-sized apertures is well defined, which simplifies the modeling of the transport across them. Compared to biological pores, the present nanochannels in Pyrex offer increased stability.

Fundamental characteristics of nanometer-sized apertures were obtained by impedance spectroscopy measurements of the nanochannel at different ionic strengths and pH values. A conductance plateau (on a log-log scale) was modeled and measured, establishing due to the dominance of the surface charge density in the nanochannels, which induces an excess of mobile counterions to maintain electroneutrality. The nanochannel conductance can be regulated at low ionic strengths by pH adjustment, and by an external voltage applied on the chip to change the zeta potential. This field-effect allows the regulation of ionic flow which can be exploited for the fabrication of nanofluidic devices.

Fluorescence measurements confirm that 50-nm-high nanochannels show an exclusion of co-ions and an enrichment of counterions at low ionic strengths. This permselectivity is related to the increasing thickness of the electrical double layer (EDL) with decreasing salt concentrations, which results in an EDL overlap in an aperture if the height of the nanochannel and the thickness of the EDL are comparable in size. The diffusive transport of charged species and therefore the exclusion-enrichment effect was described with a simple model based on the Poisson-Boltzmann equation. The negatively charged Pyrex surface of the nanometer characteristic apertures can be inversed with chemical surface pretreatments, resulting in an exclusion of cations and an enrichment of anions. When a pressure gradient is applied across the nanochannels, charged molecules are electrostatically rejected at the entrance of the nanometer-sized apertures, which can be used for separation processes.

Proteomic applications are presented such as the separation and preconcentration of proteins. The diffusion of Lectin proteins with different isoelectric points and very similar compositions were controlled by regulating the pH value of the buffer. When the proteins are neutral at their pI value, the diffusion coefficient is maximal because the biomolecules does not interact electrostatically with the charged surfaces of the nanochannel. This led to a fast separation of three Lectin proteins across the nanochannel. The pI values measured in this experiment are slightly shifted compared to the values obtained with isoelectric focusing because of reversible adsorption of proteins on the walls which affects the pH value in the nanochannel.

An important application in the proteomic field is the preconcentration of biomolecules. By applying an electric field across the nanochannel, anionic and cationic analytes were preconcentrated on the cathodic side of the nanometer-sized aperture whereas on the anodic side depletion of ions was observed. This is due to concentration polarization, a complex of effects related to the formation of ionic concentration gradients in the electrolyte solution adjacent to an ion-selective interface. It was measured that the preconcentration factor increased with the net charge of the molecule, leading to a preconcentration factor of > 600 for rGFP proteins in 9 minutes.

Such preconcentrations are important in micro total analysis systems to achieve increased detection signals of analytes contained in dilute solutions.

Compared to cylindrical pores, our fabrication process allows the realization of nanochannels on a chip in which the exclusion-enrichment effect and a big flux across the nanometer-sized aperture can be achieved, showing the interest for possible micro total analysis system applications. The described exclusion-enrichment effect as well as concentration polarization play an important role in transport phenomena in nanofluidics.

The appendix includes preliminary investigations in DNA molecule separation and fluorescence correlation spectroscopy measurements, which allows investigating the behavior of molecules in the nanochannel itself.

Keywords: concentration polarization, conductance plateau, electrical double layer, exclusion-enrichment effect, ionic strength, micro total analysis system, nanochannel, nanofluidics, nanoslit, preconcentration, permselectivity, proteomics, separation, surface charge density, surface pretreatment, zeta potential

VERSION ABREGEE

Cette thèse explore les phénomènes de transport dans un nanocanal sur puce. Cette étude fondamentale des phénomènes ioniques en nanofluidique est un premier pas vers la définition des nouvelles applications de séparations et préconcentrations pour la protéomique.

La partie expérimentale de cette thèse s'appuie sur des mesures effectuées dans un nanocanal 1D d'une épaisseur de 50 nm, qui est facilement accessible de ses deux cotés par des microcanaux. Les ouvertures nanométriques ont été fabriquées dans une structure Pyrex-silicium amorphe – Pyrex, où l'épaisseur de la couche en silicium amorphe sert d'espaceur pour définir la hauteur des nanocanaux. La géométrie des nanocanaux est ainsi bien définie, ce qui simplifie la modélisation du transport à travers ces structures. Comparées avec des pores biologiques, les nanocanaux présentés en Pyrex offrent également une stabilité accrue.

Les caractéristiques fondamentales des ouvertures nanométriques sont été mesurées par spectroscopie d'impédance du nanocanal pour divers valeurs de la force ionique et du pH. Un plateau de conductance (en graphe log-log) a été modélisé et mesuré. Il s'établit en raison de la dominance de la densité de charge de surface dans le nanocanal induisant un excès des contre-ions mobiles pour maintenir l'électroneutralité. La conductance des nanocanaux peut être régulée à des faibles valeurs de la force ionique pour des ajustements du pH et avec un potentiel électrique externe appliqué sur la puce pour changer le potentiel zeta des parois du canal. Cet effet de champ permet de réguler le flux ionique ce qui peut être exploité pour la fabrication des puces nanofluidiques.

Des mesures en fluorescence confirment que les nanocanaux de 50 nm de haut induisent une exclusion des co-ions et un enrichissement des contre-ions à des faibles forces ioniques. Cette permselectivité est mise en relation avec l'épaisseur de la double couche électrique (EDL) qui augment avec la diminution de la concentration électrolytique, résultant dans la "fermeture" du canal si la hauteur du nanocanal et l'épaisseur de l'EDL sont comparables dans leur taille. Le transport diffusif des espèces chargées et ainsi l'effet de l'enrichissement et de l'exclusion on été décrits par un modèle simple basé sur l'équation de Poisson-Boltzmann. La surface de Pyrex chargée négativement peut être inversée par des prétraitements chimiques de surface, induisant une exclusion des cations et un enrichissement des anions. En appliquant un gradient de pression à travers les nanocanaux, des molécules chargées sont rejetées électrostatiquement à l'entrée des ouvertures nanométriques, ce qui pourrait être utilisé pour un procédé de séparation.

Des applications protéomiques ont également fait l'objet d'études comme la séparation et la préconcentration de protéines. La diffusion des protéines de lectin avec des point isoélectriques (pI) différentes et des compositions très similaires a pu être contrôlée en réglant la valeur du pH de la solution. Lorsque les protéines sont neutres à leur valeur de pI, le coefficient de diffusion est maximal parce que les biomolécules n'interagissent pas électrostatiquement avec les charges de surface du nanocanal. Ceci aboutit à une séparation rapide des trois protéines de lectin à travers le nanocanal. Les valeurs de pI mesurées lors de cette expérience sont légèrement décalées par rapport à celles mesurées par focalisation isoélectrique en raison de l'adsorption réversible des protéines aux parois, influençant la valeur de pH dans le nanocanal.

Une application importante dans la branche protéomique est la préconcentration des biomolécules. En appliquant un champ électrique à travers le nanocanal, des espèces anionique et cationique ont été préconcentrées du coté cathodique de l'ouverture nanométrique tandis que du coté anodique une déplétion des ions est observée. Ce

phénomène est dû à la concentration de polarisation, un complexe des effets lié à la formation de gradients de concentration ionique dans l'électrolyte adjacent à une interface sélective par les ions. L'augmentation du facteur de préconcentration a été mesurée avec la charge nette des molécules, et des facteurs de préconcentration > 600 ont été obtenus pour des protéines rGFP, en 9 minutes. Des telles préconcentrations sont intéressantes pour des applications en micro total analysis systems pour obtenir des signaux intenses lors de la détection des espèces contenues dans des solutions diluées.

Comparé avec des pores cylindriques, notre procédé de fabrication permet de réaliser des nanocanaux sur une puce dans lesquels l'effet de l'exclusion et de l'enrichissement peut être obtenu. De plus, un grand flux est reçu à travers ces ouvertures nanométriques, faisant voir l'intérêt d'applications possibles en micro total analysis systems. L'effet de l'exclusion et de l'enrichissement, ainsi que la concentration de polarisation jouent un rôle important dans les phénomènes de transport en nanofluidique.

L'annexe contient des investigations préliminaires dans la séparation des molécules d'ADN et des mesures par spectroscopie de corrélation en fluorescence, ce qui permet d'analyser le comportement des molécules dans le nanocanal lui-même.

Mots clés : concentration de polarisation, densité de charge de surface, double couche électrique, effet de l'exclusion et de l'enrichissement, force ionique, micro total analysis system, nanocanal, nanofluidique, nanoslit, permsélectivité, plateau de conductance, potentiel zeta, préconcentration, prétraitement de surface, protéomique, séparation

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT	III
VERSION ABREGEE	V
ACKNOWLEDGMENTS	VII
TABLE OF CONTENTS.....	IX
LIST OF ABBREVIATIONS	XIII
LIST OF SYMBOLS	XV
FUNDAMENTAL CONSTANTS.....	XVIII
DERIVED UNITS.....	XVIII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 NANOFLUIDICS	1
1.2 MEMBRANE FILTRATION	2
1.2.1 Industrial applications.....	2
1.2.1.1 <i>Gas separation</i>	2
1.2.1.2 <i>Reverse osmosis</i>	2
1.2.1.3 <i>Nanofiltration</i>	3
1.2.1.4 <i>Ultrafiltration</i>	3
1.2.1.5 <i>Microfiltration</i>	3
1.3 MICRO TOTAL ANALYSIS SYSTEMS	4
1.3.1 Integrated nanoporous membranes.....	4
1.3.2 Biomedical applications.....	5
1.3.3 Protein preconcentration on-chip.....	6
1.4 MOTIVATION AND SCOPE OF THE THESIS.....	7
1.5 THESIS OUTLINE.....	8
1.6 REFERENCES.....	9
2 FLUIDS IN NANOMETER-SIZED APERTURES	11
2.1 FLAT PLATES WITH A CHARGED SURFACE	11
2.1.1 Surface charge	11
2.1.2 Electrical double layer	12
2.1.3 Potential distribution.....	13
2.1.3.1 <i>Debye-Hückel approximation</i>	14
2.1.3.2 <i>Gouy-Chapman model</i>	15
2.1.3.3 <i>Ion distribution in the electrical double layer</i>	16
2.1.3.4 <i>Surface charge density</i>	16
2.1.3.5 <i>Surface conductance</i>	16
2.1.3.6 <i>Limitations of the Poisson-Boltzmann equation</i>	17
2.1.4 Two charged surfaces in solution	17
2.1.4.1 <i>Forces between two charged surfaces</i>	17
2.1.4.2 <i>Electrical double layer overlap</i>	19
2.1.4.3 <i>Limitations</i>	19
2.2 DONNAN EXCLUSION	19
2.2.1 Donnan potential.....	19
2.2.2 Membrane potential	21
2.3 FLOW IN NANOCHANNELS	23
2.3.1 Reynolds number	23
2.3.2 Pressure-driven flow	23

2.3.3	Electroosmosis.....	24
2.3.4	Streaming potential.....	25
2.3.5	Electrophoresis	26
2.3.6	Electrokinetic phenomena	27
2.3.7	Electro-viscous effect	28
2.4	SPACE-CHARGE MODEL	29
2.4.1	Poisson-Boltzmann equation	29
2.4.2	Nernst-Planck equation.....	29
2.4.3	Navier-Stokes equation	30
2.4.4	Space-charge model for nanochannels	30
2.5	THE GLASS-WATER INTERFACE	30
2.5.1	Surface pretreatments	32
2.5.2	Layer depositions.....	33
2.6	THE ELECTRODE-ELECTROLYTE INTERFACE	34
2.6.1	Charge transfer resistance.....	34
2.6.2	Constant phase element	36
2.7	AQUEOUS SOLUTIONS	36
2.7.1	pH range	37
2.7.2	Influence of concentration on conductivity.....	37
2.8	SUMMARY	38
2.9	REFERENCES.....	38
3	FABRICATION OF NANOCHANNELS AND EXPERIMENTAL SET-UP.....	45
3.1	STATE OF THE ART	45
3.1.1	Etching of nanochannels.....	45
3.1.2	Sacrificial layer.....	46
3.1.3	High energy beams	47
3.1.4	Nanoimprint lithography	48
3.1.5	Bonding/ sealing.....	49
3.2	FABRICATION PROCESS	49
3.2.1	1D nanochannels	49
3.2.2	2D nanochannels	52
3.3	DESIGN OF THE CHIP	53
3.4	EXPERIMENTAL SET-UP.....	54
3.4.1	Interconnection block	54
3.4.2	Microscope	54
3.4.3	Fluidic network.....	54
3.5	CONCLUSION AND OUTLOOK	55
3.6	REFERENCES.....	56
4	ELECTRICAL CHARACTERIZATION OF NANOCHANNELS.....	59
4.1	MOTIVATION	59
4.1.1	Current blockage	59
4.1.2	Electric field mediated transport.....	60
4.2	DC MEASUREMENTS	61
4.3	AC IMPEDANCE MEASUREMENTS.....	62
4.3.1	Materials and methods.....	63
4.3.2	Nanochannel resistance	64
4.4	MODEL	64
4.5	RESULTS AND DISCUSSION	67
4.5.1	Number of nanochannels	67
4.5.2	pH dependence	68

4.5.3	Field-effect.....	68
4.6	CONCLUSION AND OUTLOOK.....	70
4.7	REFERENCES.....	70
5	THE EXCLUSION-ENRICHMENT EFFECT	73
5.1	BIOLOGICAL INSPIRATION.....	73
5.2	THE EXCLUSION-ENRICHMENT EFFECT.....	74
5.2.1	Mathematical description.....	75
5.3	MATERIALS AND METHODS.....	77
5.3.1	Materials	77
5.3.2	Typical diffusion time	78
5.3.3	Fluorescence detection.....	78
5.3.4	Measurement quality	80
5.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	81
5.4.1	Permselectivity of nanochannels	81
5.4.2	Model of the exclusion-enrichment effect.....	83
5.4.3	Limitations of the model.....	85
5.4.4	Surface charge modifications	87
5.4.5	Separation processes.....	88
5.5	CONCLUSION AND OUTLOOK.....	89
5.6	REFERENCES.....	89
6	PROTEOMIC APPLICATIONS	93
6.1	GENERAL ASPECTS.....	93
6.2	PH-CONTROLLED DIFFUSION ACROSS A NANOCHANNEL.....	94
6.2.1	Related separation methods	94
6.2.2	Materials and methods.....	95
6.2.3	Mathematical description of diffusion.....	96
6.2.4	Results and discussion	97
6.2.5	Conclusion and outlook	101
6.3	PRECONCENTRATION	103
6.3.1	Current transport through nanochannels.....	105
6.3.1.1	<i>Concentration polarization.....</i>	<i>105</i>
6.3.1.2	<i>The limiting current.....</i>	<i>106</i>
6.3.1.3	<i>Field-induced space charges</i>	<i>107</i>
6.3.2	Materials and methods.....	109
6.3.3	Results and discussion	110
6.3.3.1	<i>Ionic dyes.....</i>	<i>110</i>
6.3.3.2	<i>Proteins.....</i>	<i>112</i>
6.3.4	Conclusion and outlook	112
6.4	REFERENCES.....	113
7	SUMMARY AND OUTLOOK	117
7.1	SUMMARY	117
7.2	OUTLOOK	118
7.3	REFERENCES.....	119
APPENDIX	INVESTIGATIONS IN DNA MOLECULE SEPARATION.....	121
A.1	STATE OF THE ART IN DNA MOLECULE MANIPULATIONS.....	121
A.1.1	DNA molecule separation.....	121
A.1.1.1	<i>Nanometer-sized constriction</i>	<i>122</i>
A.1.1.2	<i>Pillar array.....</i>	<i>125</i>
A.1.2	DNA molecules in nanopores.....	127
A.1.2.1	<i>Current decrease</i>	<i>127</i>

A.1.2.2	<i>Current increase</i>	128
A.1.3	Label-free DNA molecule detection.....	129
A.2	DNA MOLECULE DETECTION IN NANOCHANNELS	130
A.2.1	Materials and methods.....	131
A.2.2	Theoretical aspects of biomolecules in nanochannels.....	132
A.2.2.1	<i>Relative conductance change</i>	132
A.2.2.2	<i>Number of DNA molecules in a nanochannel</i>	132
A.2.2.3	<i>Importance of ionic strength on relative conductance change</i>	133
A.2.3	Results and discussion.....	133
A.2.3.1	<i>DNA complex translocation</i>	133
A.2.3.2	<i>DNA molecule manipulations at the nanochannel interface</i>	136
A.2.3.3	<i>Continuous conductance measurements</i>	138
A.2.4	Conclusion and outlook.....	139
A.3	FCS MEASUREMENTS IN NANOCHANNELS	140
A.3.1	Autocorrelation function	140
A.3.2	Preliminary results.....	140
A.3.3	Conclusion and outlook.....	141
A.4	REFERENCES.....	142
	CURRICULUM VITAE	145