

Dynamic ellipsometry, biochemical and biomedical applications

Citation for published version (APA):

Cuypers, P. A. (1976). *Dynamic ellipsometry, biochemical and biomedical applications*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19760507pc>

Document status and date:

Published: 01/01/1976

DOI:

[10.26481/dis.19760507pc](https://doi.org/10.26481/dis.19760507pc)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

This thesis describes the development of an ellipsometer useful for biochemical experiments.

The ellipsometer is an optical instrument that can be used to measure the thickness and the refractive index of thin transparent layers deposited on a reflecting surface. A big number of unsolved medical, biochemical and biophysical problems concern processes occurring at interphases. Some examples are membrane transport, nerve conduction, oxydative phosphorylation, thrombogenesis etc.

Consequently it is very important to have an apparatus that can measure thickness and refractive index of layers of biological molecules at an interphase. The ellipsometric technique in principle allows such measurements, however, the major part of the apparatuses were until now not able to do so within 5 minutes, which is too slow for biochemical experiments. The developed recording ellipsometer which could follow the change in light intensity reaching the photodiode continuously, could measure biochemical experiments fast enough but in this case it was not possible to discriminate between polarizer and analyzer changes, consequently these experiments can in general not be interpreted in terms of thickness or refractive index.

We developed a dynamic ellipsometer which follows both analyzer and polarizer automatically in time.

Chapter I summarizes the techniques available in the study of protein-protein- and protein-lipid-interactions and reviews some of the obtained results.

Chapter II describes the measuring principle, electronic circuits and the computer steered stepping motors.

In Chapter III a general survey of the optical theory, necessary to understand the apparatus and the interpretation of the results is given.

Subjects of Chapter IV are the theoretical analysis of the influence of the different parameters on the sensitivity of the measurements and the computer program for the interpretation of these experiments.

Chapter V gives the development of some standard experiments that can be used to calibrate the instrument and to calculate the corrections necessary to compensate the non-ideal behaviour of the optical components.

Chapter VI gives a number of illustrations of the technique applied for the unraveling of the following medical-biological problems:

1. Adsorption of a.o. fibrinogen and albumin onto different surfaces. All proteins tested adsorb onto chromium and silicon until a monolayer is obtained. The thickness of the layer varies with the water content.
The water content of the layer is influenced by the hydrophobicity of the surface. There is a relation between the thickness of the layer and the found refractive index. This relation is hyperbolic in a good approximation.
2. Interaction of proteins with their antibodies. By means of ellipsometry it is possible to observe a reaction of a monolayer of protein ($< 10^{-11}$ grammol) with a monolayer of antibody ($< 10^{-11}$ grammol).
3. Fibrinogen displaces proteins adsorbed before, like albumin and serum proteins from chromium surfaces.

ZUSAMMENFASSUNG

Diese Dissertation beschreibt die Entwicklung eines Ellipsometers für biochemische Zwecke. Das Ellipsometer ist ein optisches Instrument, das verwendet wird um die Dicke und den Brechungsindex dünner durchsichtiger Schichten auf einer reflektierenden Oberfläche zu messen. Viele ungelöste medizinische, biochemische und biophysikalische Probleme betreffen Prozesse, die sich an Grenzflächenabspielen. Beispiele dafür sind Membrantransport, Reizleitung, oxydative Phosphorylierung, Thrombogenesis usw. Deshalb ist es sehr wichtig, ein Instrument zu haben, das Dicke und Brechungsindex biologischer Molekülschichten auf einer Grenzfläche messen kann. Die ellipsometrische Technik ermöglicht dies. Die vorhandene Apparatur war aber nicht geeignet für diese Zwecke. Man hatte nur ein statisches Ellipsometer zur Verfügung, das genau die Änderungen des Lichtpolarisationszustandes messen kann und in dieser Weise genaue Bestimmungen der Dicke und des Brechungsindex ermöglicht, aber nur eine Messung pro 5 bis 10 Minuten durchführt, was für dynamische biochemische Prozesse nicht genügt. Daneben gab es ein Ellipsometer, das kontinuierlich nur die Lichtintensität des von dem Instrument durchgelassenen Lichtes mass, so dass nur ungefähre Schätzungen der Dicke oder des Brechungsindex möglich waren. Wir entwickelten ein Instrument, das beide Parameter automatisch misst mit Unterbrechungen von $2\frac{1}{2}$ bis 5 Sekunden.

Kapitel I beschreibt im kurzen die bis heute verwendeten Techniken zur Untersuchung von Protein-Protein- und Protein-Lipid Interaktionen und gibt eine Übersicht der damit erreichten Ergebnisse.

Wirkungsprinzip, elektronische Eigenschaften, Lenkung der Stufenmotoren und das vom Computer gelenkte Messverfahren werden im Kapitel II beschrieben.

Kapitel III gibt eine kurze Übersicht der Theorie, die man braucht zur Deutung der Wirkung des Apparats, und der Ergebnisse. Die theoretische Analyse des Einflusses der verschiedenen Variablen auf die Empfindlichkeit der Messungen und der Computerprogramme für die Beobachtungsdeutung findet man im Kapitel IV. Kapitel V beschreibt die Entwicklung von Normalversuchen zur Eichung des Instruments und zur Berechnung von Korrekturen für nicht-ideale Wirkungen der optischen Komponenten.

Kapitel VI beschreibt eine Anzahl von mit dieser Technik bearbeiteten biomedizinischen Problemen z.B.

1. Adsorption von Fibrinogen und Albumin an verschiedenen Oberflächen. Es stellt sich heraus dass alle geprüften Proteine an Chrom oder Silicon adsorbiert werden, bis sich eine monomolekulären Schicht hergestellt hat. Die Schichtdicke variiert mit dem Wassergehalt. Der Wassergehalt der Schichten wird beeinflusst von der Hydrophilität der Oberfläche. Zwischen der Schichtdicke und dem Brechungsindex besteht ein Zusammenhang der fast hyperbolisch ist.
2. Interaktionen von Proteinen mit ihren Antikörpern. Es ist möglich, mit Hilfe der Ellipsometertechnik, unmittelbar die Reaktion einer Proteinmonoschicht ($< 10^{-11}$ Grammmol) mit einer Antikörpermonoschicht ($< 10^{-11}$ Grammmol) zu beobachten.
3. Fibrinogen verdrängt adsorbierte Proteine wie Albumin und Serumproteine von Chromoberflächen.

RÉSUMÉ

L'objet de cette thèse est la description des modifications d'un ellipsomètre. Ces modifications ont été rendues nécessaires pour permettre des études biochimiques.

L'ellipsomètre est un instrument d'optique qui permet de mesurer l'épaisseur et l'indice de réfraction de couches minces et transparentes se trouvant sur des surfaces réfléchissantes. De nombreux problèmes non résolus qui se posent dans les domaines médicaux, biochimiques, biophysiques et biomédicaux, concernent des processus qui se passent au niveau des interfaces liquide - solide, par exemple: les transports transmembranaires, la conduction nerveuse, la phosphorylation oxydative, la thrombogenèse. Il est donc important de posséder un instrument qui soit capable de mesurer l'épaisseur et l'indice de réfraction de couche de molécules de substances biologiques se trouvant à ces interfaces.

La technique ellipsométrique permet de telles mesures. Cependant les appareils existants n'étaient pas aptes à le faire. En effet, on ne disposait que d'ellipsomètres statiques qui pouvaient mesurer exactement des modifications de lumière polarisée et permettaient ainsi de déterminer d'une manière précise l'épaisseur et l'indice de réfraction. Avec ces instruments le temps nécessaire pour effectuer une mesure était compris entre 5 et 10 minutes ce qui est beaucoup trop long pour suivre un processus biochimique. Il était également possible d'effectuer des mesures d'une manière continue mais seulement de l'intensité lumineuse transmise par l'instrument de telle sorte que soit l'épaisseur soit l'indice de réfraction pouvait être estimé d'une manière grossière.

Nous avons développé un instrument capable de suivre automatiquement ces 2 paramètres à des intervalles variant entre $2\frac{1}{2}$ et 5 secondes.

Le chapitre I résume les techniques utilisées jusqu'à présent pour l'étude des interactions protéines-protéines et protéines-lipides aux interfaces et il donne également une vue générale des résultats obtenus.

La description de l'appareil en ce qui concerne son principe de fonctionnement, son schéma électronique, son mode d'emploi et le procédé de mesure dirigé par computer est traité dans le chapitre II.

Le chapitre III donne une vue globale de la théorie nécessaire à la compréhension du fonctionnement de l'appareil et à l'interprétation des résultats. L'analyse théorique de l'influence des différentes variables sur la sensibilité des mesures et celles des programmes du computer pour l'interprétation des résultats est traitée dans le chapitre IV.

Dans le chapitre V on développe des expériences standards qui permettent d'étalonner l'instrument et de tenir compte de corrections nécessaires lors du comportement non idéal des composants optiques.

Le chapitre VI donne une série d'illustrations de l'application de cette technique aux problèmes biologiques et médicaux suivants:

1. L'adsorption du fibrinogène et de l'albumine sur différentes surfaces.

Il semble que toutes les protéines testées s'adsorbent sur le chrome ou le silicium sous la forme d'une couche mononucléaire. L'épaisseur de la couche varie avec la teneur en eau.

La teneur en eau de la couche est influencée par la nature hydrophyle de la surface. La relation entre l'épaisseur de la couche et l'indice de refraction est de nature hyperbolique.

2. L'interaction entre les protéines et leurs anticorps.

Il semble possible à l'aide de l'ellipsomètre d'observer directement la réaction entre une couche monomoléculaire de protéine ($< 10^{-11}$ molécule gramme) et une couche monomoléculaire ($< 10^{-11}$ molécule gramme).

3. Le fibrinogène décolle d'une surface en chrome des protéines adsorbées auparavant sur celle-ci telle l'albumine des protéines du sérum.

KOMPENDIUM

Dees dissertasie besjreif wie mèt vaöl belump 'nen ellipsometer woord ineingefisternöld dee ziech lient veur biochemisch gebruik. U'n ellipsometer is 'n optisch instrumint wat in staot is de dikte en brekingsindex te mete vaan dun, doorziechtige laögskes die op e reflekterend oppervlak zitte.

'n Groete struip oonopgelosde medische, biochemische, biofysische en biomedische probleme regardere processe die ziech aon grensvlakke aofspeule, zoe wie beveurbeeld membraantransport, de geleijing vaan steekskes door de zenuwbaone, oxydatieve fosforylering, 't oontstaan vaan thromboos en zoe mie. 't Is daorum vaan importantie 'n instrumint te höbbe, wat dikte en brekingsindex (bezettingsgraad) vaan laoge vaan biologische molekule in e grensvlak kin mete. De ellipsometrische techniek maak dit in prinsiep meugelek. De bestaonde appretuur dougde dao evels neet veur. Me had naomelek wel de statische ellipsometer, dee puntelik de veranderinge in de polarisatietowstand vaan 't leech kin mete en zoe de eksakte bepaoling vaan dikte en brekingsindex meugelek maak, meh boe mer ein meting um de 5 à 10 minute mèt kôs weure gedoon, wat veur dynamische biochemische processe neet genóg is.

Ouch had me ellipsometers die kontinu allein mër de intensiteit mete vaan 't leech wat door 't instrumint weurd doorgelaote, boedoor óf vaan dikte óf vaan brekingsindex allein mer groof taxaties meugelek zien.

Veer höbbe 'n instrumint oetgeprakkezeerd wat allebey de parameters otomatisch vervolg mèt intervalle vaan $2\frac{1}{2}$ tot 5 sekonde.

Hoofstök I gief 'n korte inventarisatie vaan de technieke, die tot noe tow veurnaomelek zien gebruik veur 't bestudere vaan eiwit-eiwit en eiwit-lipide interaksies aon interfases en gief 'n euverziech vaan de rizzeltaote die daomèt zien behaald. De besjreiving vaan 't apperaat wat betröf wërrekingssprinsiep, elektronische regelinge, 't sture vaan de stepke-veur-stepke drejjende motors en de door de kompjoeter bestuurde meetproceduur weure in hoofstök II besjreve.

In hoofstök III weurd e kort globaal euverziech gegeve vaan de theorie die nudig is um 'n inziech te kinne krieve in de wërreking vaan 't apperaat en um de rizzeltaote te kinne interpreteere.

De theoretische besjowwing euver de inwërreking vaan de versjeije variabele op de gevoeligheid vaan de metinge en daobij ouch de kompjoeter-programma's veur de interpretasie vaan de observasies weure in hoofstök IV behandeld.

In hoofstök V weure standaardeksperimente oet de deuk gedoon die goojen deens kinne doen bij 't ijke vaan de klömmel en bij de besiefering vaan de korrekties veur 't geval 't gedrag vaan de optische komponente neet ideaal is.

Hoofstök VI gief 'n hamfel illustrasies vaan d'n techniek, towgepas op de volgende medisch-biologische probleme:

1. Adsorptie vaan o.a. fibrinogeen en albumine aon versjeije oppervlakke. Daobij blik tot alle beproofde eiwitte op chroom- en siliciumoppervlakke weure vasgehawwe totdat 'n laag is oontstande die monomolekulaair is. De dikte vaan de laag varieert mèt 't watergehalte. 't Watergehalte vaan de laag weurd o.a. mètbepaold door de wateraontrèkkingskrach vaan 't oppervlak. Dao is e verband tösse laagdikte en brekingsindex, wat - es alles good zit - hyperbolisch is.
2. Interaksies vaan eiwitte mèt hun anti-liechame. 't Blik meugelek um m.b.v. ellipsometrie direk de reaksie vaan 'n monolaag eiwit ($< 10^{-11}$ grammol) mèt 'n monolaag antiliechaam ($< 10^{-11}$ grammol) te konstatere.
3. Fibrinogeen verdringk al ieder geadsorbeerde eiwitte, zoe wie albumine en serumeiwitte, vaan chroomoppervlakke.

SAMENVATTING

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van een ellipsometer geschikt voor biochemisch gebruik. De ellipsometer is een optisch instrument dat in staat is de dikte en brekingsindex te meten van dunne doorzichtige laagjes die zich op een reflektierend oppervlak bevinden. Een groot aantal onopgeloste medische, biochemische, biofysische en biomedische problemen betreffen processen die zich aan grensvlakken afspelen. Men denke b.v. aan membraantransport, prikkelgeleiding, oxydatieve fosforylering, thrombogenese etc. Het is daarom van groot belang om te beschikken over een instrument dat dikte en brekingsindex (bezettingsgraad) van lagen van biologische molekulen in een grensvlak kan meten. De ellipsometrische techniek maakt dit in principe mogelijk. De bestaande apparatuur was echter niet geschikt. Men beschikte nl. over de statische ellipsometer, die nauwkeurig de veranderingen in de polarisatietoestand van het licht kan meten en zodoende exakte bepaling van dikte en brekingsindex mogelijk maakt, maar slechts één meting per 5 à 10 minuten toestaat, hetgeen voor dynamische biochemische processen onvoldoende is of over ellipsometers die kontinu slechts de lichtintensiteit van het door het instrument doorgelaten licht meten waardoor of van dikte of van brekingsindex slechts ruwe schattingen mogelijk zijn. Wij ontwikkelden een instrument dat beide parameters automatisch vervolgt met intervallen van $2\frac{1}{2}$ à 5 seconden.

Hoofdstuk I somt in het kort de technieken voor het bestuderen op, die tot nu toe voornamelijk gebruikt zijn voor het bestuderen van eiwit-eiwit- en eiwit-lipide interacties aan interfases en geeft een overzicht van de daarmee bereikte resultaten.

De beschrijving van het apparaat wat betreft werkingsprincipe, elektronische regelingen, sturing van de stappenmotoren en de computer gestuurde meetprocedure worden in hoofdstuk II beschreven.

In hoofdstuk III wordt een kort globaal overzicht gegeven van de theorie die nodig is om een inzicht te kunnen krijgen in de werking van het apparaat en om de resultaten te kunnen interpreteren. De theoretische analyse van de invloed van de verschillende variabelen op de gevoeligheid van de metingen en de computerprogramma's voor de interpretatie van de waarnemingen worden in hoofdstuk IV behandeld. In hoofdstuk V worden standaardexperimenten ontwikkeld die kunnen dienen om het instrument te ijken en om correcties voor niet-ideaal gedrag van de optische componenten te berekenen.

Hoofdstuk VI geeft een aantal illustraties van de techniek toegepast op de volgende medisch-biologische problemen:

1. Adsorptie van o.a. fibrinogeen en albumine aan verschillende oppervlakken. Het blijkt dat alle geteste eiwitten op chroom en silicium adsorberen tot een monomoleculaire laag verkregen is. De dikte van de laag varieert met het watergehalte. Het watergehalte van de laag wordt o.a. beïnvloed door de hydrofili-
liteit van het oppervlak. Er is een verband tussen laagdikte en brekingsindex dat in goede benadering hyperbolisch is.
2. Interakties van eiwitten met hun antilichamen. Het blijkt mogelijk om met behulp van ellipsometrie direkt de reactie van een monolaag eiwit ($< 10^{-11}$ grammol) met een monolaag antilichaam ($< 10^{-11}$ grammol) waar te nemen.
3. Fibrinogeen verdringt reeds eerder geadsorbeerde eiwitten zoals albumine en serumeiwitten van chroomoppervlakken.