

Дослідження впливу охолодження й гліцерину на фізичний перетворювач біосенсорів

В.І.Грищенко, О.А.Нардід, К.Д.Розанова, М.І.Шетинський, Д.О.Мангасаров
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Investigation of Cooling and Glycerol Effect on Biosensor Transducer

GRISCHENKO V.I., NARDID O.A., ROZANOVA K.D., SCHETINSKY M.I., MANGASAROV D.O.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Розроблено рекомендації щодо низькотемпературного зберігання фізичних перетворювачів: повільне охолодження при силіконовому захисному шарі або швидке охолодження при захисному шарі з епоксидного лаку після обробки поверхні 25%-м розчином гліцерину.

Ключові слова: біосенсор, фізичний перетворювач, кріоконсервування.

Разработаны рекомендации по низкотемпературному сохранению физических преобразователей: медленное охлаждение при силиконовом защитном слое или быстрое охлаждение при защитном слое из эпоксидного лака после обработки поверхности 25%-м раствором глицерина.

Ключевые слова: биосенсор, физический преобразователь, криоконсервирование.

There have been developed the recommendations as for low temperature preservation of transducers: slow cooling with silicone protective layer or rapid one with a protective layer of epoxy lacquer after treatment of the surface with 25% glycerol solution.

Key words: biosensor, transducer, cryopreservation.

Сучасні потреби медичної та ветеринарної діагностики, охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, якості харчових продуктів і питної води диктують необхідність розробки принципово нових високочутливих, селективних, швидких та економічних аналітичних систем. Саме ними можуть бути біосенсори – гібридні прилади нового покоління, які об'єднують у собі біоселективний елемент і фізичний перетворювач [1]. При цьому в біосенсорах використовують біологічні структури різного рівня організації: окремі молекули (ферменти, антитіла, полінуклеотиди), надмолекулярні елементи (рецептори), клітини, органи і навіть цілісні організми. Інтенсивна робота по розробці, створенню і впровадженню біосенсорів потребує сучасних методів їх збереження. Експериментальні дослідження, які проводяться в останній час, дозволяють виявити деякі особливості зберігання біосенсорних датчиків в основному при температурах, близьких до кімнатної, і температурі побутового холодильника [2], хоч є повідомлення про спроби використання низьких температур і деяких органічних сполук, які виконують роль кріозахисних речовин при збереженні [3,4]. Подальше розширення термінів зберігання біосенсорів може ґрунтуватись на впровадженні технологій низькотемпературного консервування з використанням

Current needs of medical and veterinary diagnostics, environmental protection, control of biotechnological processes of the quality of food products and potable water dictate the necessity of working-out of principally new highly sensitive, selective, rapid and efficient analytical systems. It is them are the biosensors, hybrid devices of new generation, which comprise bioselective element and transducer [1]. In this case in biosensors there are used biological structures of different organization level: some molecules (enzymes, antibodies, polynucleotides), over-molecular elements (receptors), cells, organs and even solid organisms. An intensive work on the development, creation and introduction of biosensors requires the modern methods of their preservation. Experimental investigations which have been carried out recently permit to reveal some peculiarities of preservation of biosensor gauges, mainly at the temperatures close to room one and the temperature of domestic refrigerator. [2]. Though there are the reports about the attempts to use low temperatures and some organic compounds, which play the role of cryoprotective agents during storage [3, 4]. Further extending of the preservation terms for biosensors can be based on the technology of low temperature preservation using the temperatures of liquid nitrogen. However even the transducer of biosensors itself is a complicated element, each

Адреса для кореспонденції: Нардід О.А. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, г. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 7726141, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Nardid O.A. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 772 6141, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

температур рідкого азоту, чи близьких до них, але навіть сам фізичний перетворювач біосенсорів є складним елементом, кожна частка якого може зазнати суттєвих пошкоджень при низькотемпературному зберіганні. Тому визначення впливу умов зберігання у рідкому азоті та режимів заморожування-відтаювання на захисний шар, поверхню та гребінки електродів є актуальною проблемою.

Матеріали і методи

Були проведені дослідження впливу режимів охолодження на поверхню, захисний шар і гребінки електродів фізичних перетворювачів різних типів:

1 – рН-чутливих польових транзисторів, захисний шар – епоксидний клей, (“Мікропроцесор”, м. Київ, та “LAACE”, м. Тулуза, Франція);

2 – тонкоплівчастих кондуктометричних електродів, захисні шари – епоксидний лак і силікон, Pt на склі (“Institute chemo- and biosensors, Munster, Германия”), епоксидний клей та фоторезист, Au на кремнії (Institute microelectronics, New-Shatell, Швейцарія та “Квазар”, м. Київ), силікон, Cr на ситалі (Київський радіозавод).

Повільне (3°C/хв) та швидке охолодження (3000°C/хв) фізичних перетворювачів до температури рідкого азоту задавалися за допомогою програмного заморожувача УОП-8, розробленого ПКІК НАНУ, і зануренням у рідкий азот.

Мікроскопічні дослідження проводили на мікроскопі Jenamed-2 (Германія).

Результати досліджень

Повільне охолодження і зберігання у рідкому азоті протягом місяця не впливало на цілісність гребінок електродів, поверхню та захисний шар як тонкоплівчастих кондуктометричних електродів, так і рН-чутливих польових транзисторів. При швидкому охолодженні відбувалося розтріскування захисного шару з епоксидного клею (фото 1 і 2) та епоксидного лаку (фото 3), а фоторезист покрився невеликими тріщинами. У той же час захисний шар із силікону залишився непошкодженим. Швидке охолодження не привело до пошкоджень самих гребінок електродів і поверхні. При обробленні 25%-м розчином гліцерину захисних шарів, найбільш чутливих до швидкого охолодження біосенсорів, помітного розтріскування у випадку використання епоксидного лаку (фото 4) не відбувалося. Водночас покриття з епоксидного клею товщиною більше ніж 1,5 мм зазнало суттєвих пошкоджень і при обробці 25%-м розчином гліцерину.

part of which may be damaged during low temperature preservation. Therefore the determining of the storage conditions effect for liquid nitrogen and freeze-thawing regimens on protective layer, surface and comb electrodes is an actual task.

Materials and Methods

There have been performed the investigations on the effect of cooling regimens on the surface, protective layer and electrode comb of transducers of various types:

1 – pH-sensitive field transistors, as a protective layer is epoxy adhesive (“Microprocessor”, Kiev, and “LAACE”, Toulouse, France);

2 – thin film conductometric electrodes, as a protective layer is epoxy lacquer and Si, Pt on glass (Institute of chemo- and biosensors, Munster, Germany), epoxy adhesive and photoresist, Au on Si (Institute of micro-electronics, New-Shatell, Switzerland and “Kvazar”, Kiev), silicone, Cr on glass ceramic (Kiev radio plant).

Slow (3°C/min) and rapid cooling (3000°C/min) of transducers down to the temperature of liquid nitrogen were accomplished using UOP-8 programmable freezer, designed by IPC&C of the National Academy of Sciences of the Ukraine. Microscopic studies were done with Jenamed-2 microscope (Germany).

Results and Discussion

Slow cooling and storage in liquid nitrogen during a month did not influence on the integrity of electrode combs, surface and protective layer both of thin film conductometric electrodes and pH-sensitive field transistors. During cold cooling there was cracking of protective layer of epoxy adhesive (Fig. 1 and 2) and epoxy lacquer (Fig. 3) and photo resistor was covered with small cracks. At the same time protective layer of silicone kept as undamaged. Rapid cooling did not result in the damage of the electrode combs and surfaces themselves. When treating the protective layers which are the most sensitive to rapid cooling biosensors with 25% glycerol solution there was no significant cracking in the case of the usage of epoxy lacquer (Fig. 4). At the same time the covering with epoxy adhesive of more than 1.5 mm in width was considerably damaged as well as after the treatment with 25% glycerol solution.

Conclusion

Thus during low temperature storage of transducers there can be recommended either slow cooling with silicone protective layer or rapid one with a

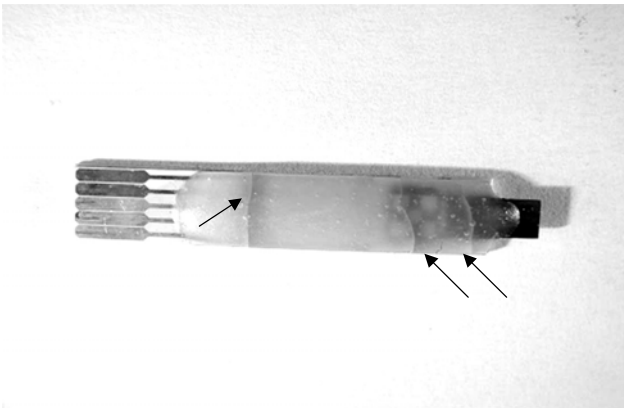


Фото 1. Розтріскування захисного шару з епоксидного клею при швидкому охолодженні.

Fig. 1. Cracking of protective layer of epoxy adhesive during rapid cooling.

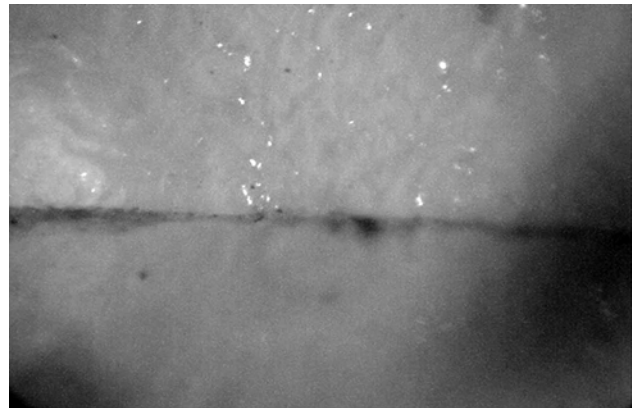


Фото 2. Розтріскування захисного шару з епоксидного клею при швидкому охолодженні (100-разове підсилення).

Fig. 2. Cracking of protective layer of epoxy adhesive during rapid cooling (100-fold magnification).

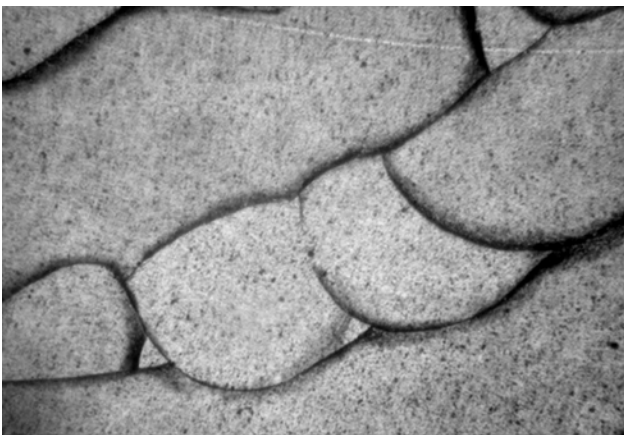


Фото 3. Розтріскування захисного шару з епоксидного лаку при швидкому охолодженні (100-разове підсилення).

Fig. 3. Cracking of protective layer of epoxy lacquer during rapid cooling (100-fold magnification).



Фото 4. Зберігання захисного шару з епоксидного лаку при швидкому охолодженні при обробці 25% -м розчином гліцерину (100-разове підсилення).

Fig. 4. Keeping of protective layer of epoxy lacquer during rapid cooling when treating it with 25% glycerol solution (100-fold magnification).

Висновки

Таким чином, при низькотемпературному зберіганні фізичних перетворювачів можна рекомендувати повільне охолодження при силіконовому захисному шарі або швидке охолодження при захисному шарі з епоксидного лаку після обробки поверхні 25%-м розчином гліцерину, який, до речі, додається при формуванні біоселективних мембран усіх типів, оскільки запобігає розтріскуванню мембран і значно покращує їхню адгезію до поверхні фізичних перетворювачів.

protective layer of epoxy lacquer after treatment of the surface with 25% glycerol solution, which is added during the formation of bioselective membranes of all types, because it prevents cracking of membranes and significantly improves their adhesion to the surface of transducers.

Література

1. *Ельська Г.В., Корпан Я.І.* Біосенсорні технології : реалії та перспективи // Вісник НАН України– 2000.– №3.– С. 36-40.
2. *Korpan Y.I., Dzyadevich S.V, Zharova V.P., Elskaya A.V.* Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells // Укр. биохим. журн.– 1994.– Vol.66, №1– С. 78-82.
3. *Nistor C., Emneus J., Gorton L., Cincu A.* Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes

References

1. *Elska G.V., Korpan Ya.I.* Biosensor technologies: reality and prospects // Visnyk NAN Ukrainy– 2000.– N 3. – P. 36-40.
2. *Korpan Y.I., Dzyadevich S.V, Zharova V.P., Elskaya A.V.* Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells // Укр. биохим. журн.– 1994.– Vol.66, №1– С. 78-82.
3. *Nistor C., Emneus J., Gorton L., Cincu A.* Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds // Anal.Chem. Acta.– 1999.– Vol. 387.– P. 309-326.
4. *Yagar H., Sagiroglu A.* Non-covalent immobilization of anince

for detection of phenolic compounds // Anal.Chem. Acta.–
1999.– Vol. 387.– P. 309-326.

4. *Yagar H., Sagiroglu A.* Non-covalent immobilization of aninse
(*Cydonia olonga*) polyphenoloxidaza on alumina // Acta Chim.
Cluv.– 2002.– Vol. 49.– P. 893-902.

(*Cydonia olonga*) polyphenoloxidaza on alumina // Acta Chim.
Cluv.– 2002.– Vol. 49.– P. 893-902.

Accepted in 21.10.2003

Надійшла 21.10.2003