

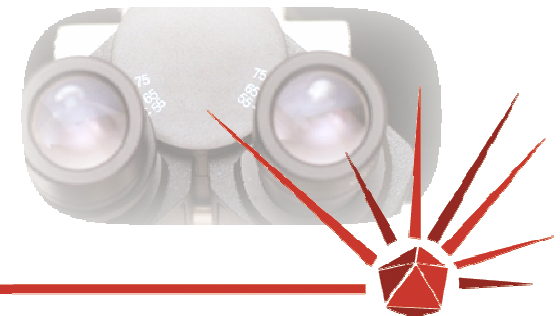
NANOSIGHT



NanoSight:

NanoSight - bezpośrednia wizualizacja, określanie rozmiaru i zliczanie nanocząstek w trakcie procesu agregacji protein oraz wpływ różnego rodzaju wody na agregację nanocząstek.

Agnieszka Siupa
www.nanosight.com

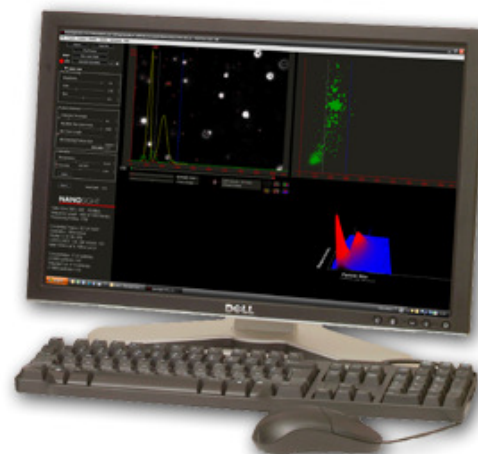


Urządzenia:

NANOSIGHT - unikalna
technologia wizualizacji i
analizy nanocząstek
w suspensji



LM10 Series



LM20

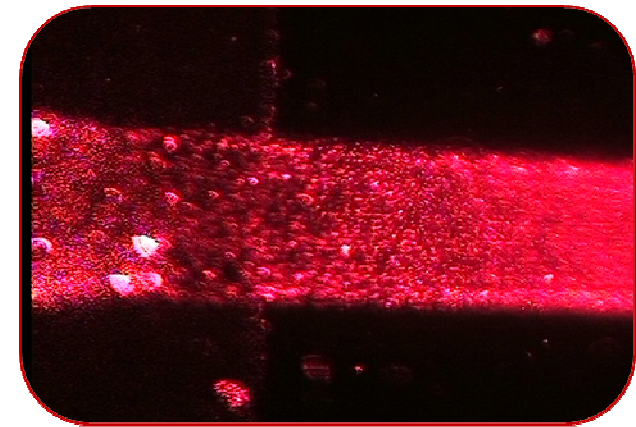
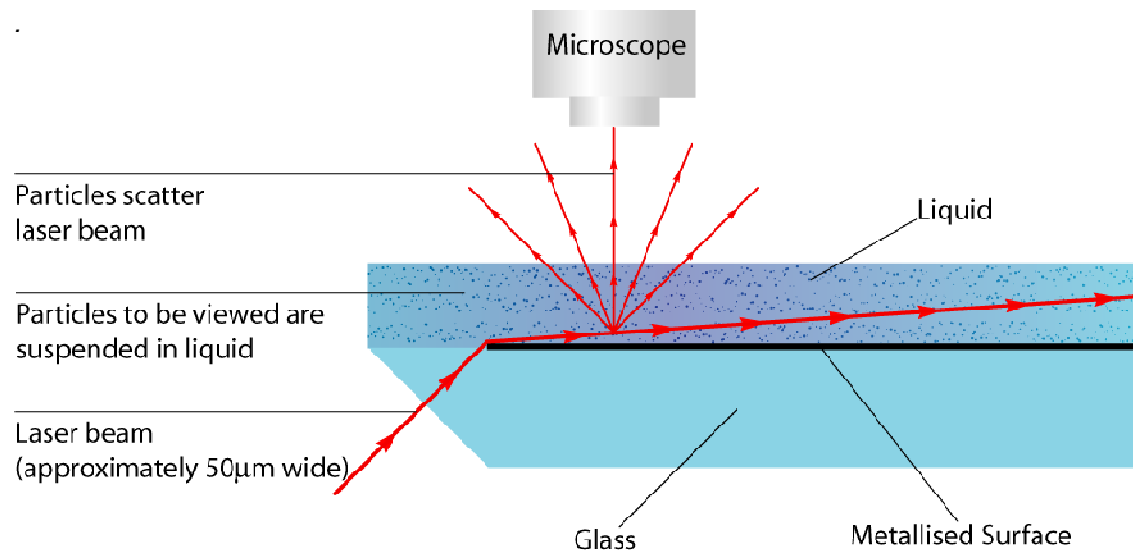


NS500



Technologia Nanosight

- Metalizowany element optycznoświetlany przez wiązkę lasera
- Nanocząstki poruszające się pod wpływem ruchów Browna rozpraszają światło lasera



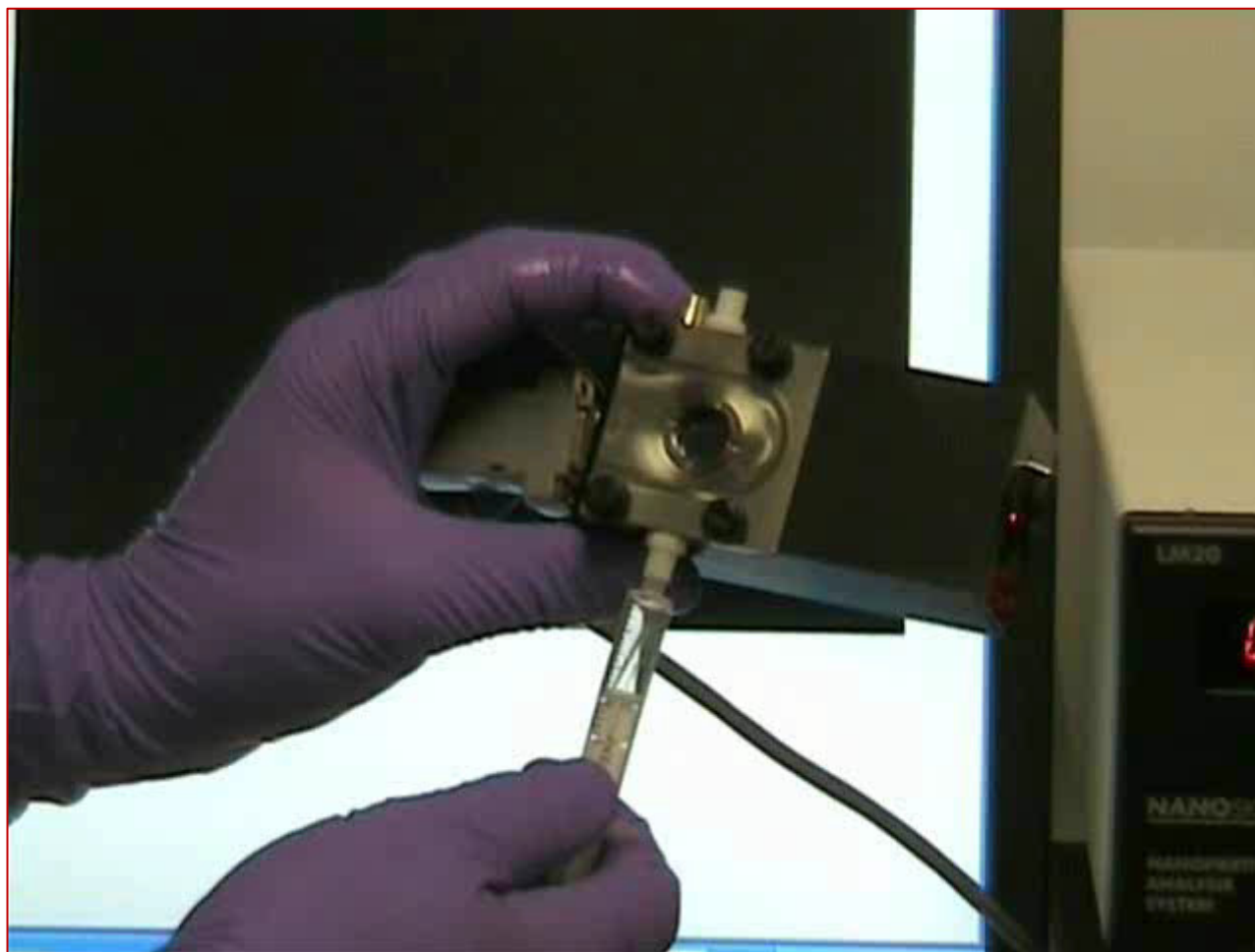
Wązka lasera widziana w niewielkim powiększeniu



Urządzenie NANOSIGHT LM20



System NANOSIGHT LM20 w użyciu



Wprowadzenie
próbki

Umieszczenie elementu
próbki w urządzeniu

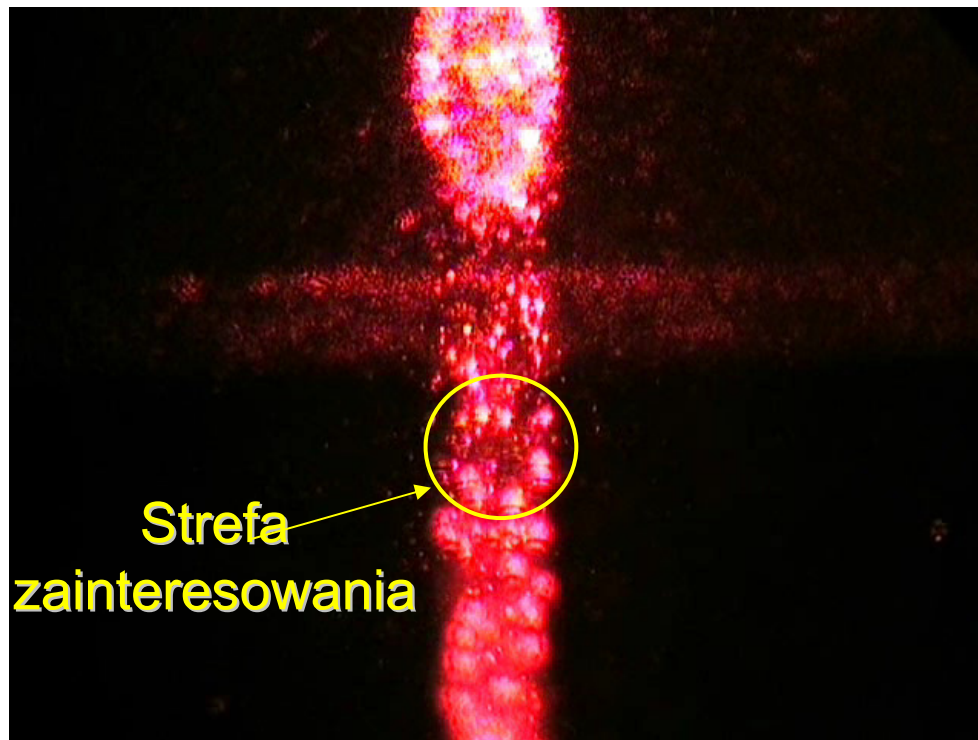
Obserwacja
nanocząstek



System NANOSIGHT w praktyce

-obraz mikroskopowy

Obraz wiązki przechodzącej przez próbkę i jej odpowiednie powiększenie do uzyskania optymalnego pola widzenia.

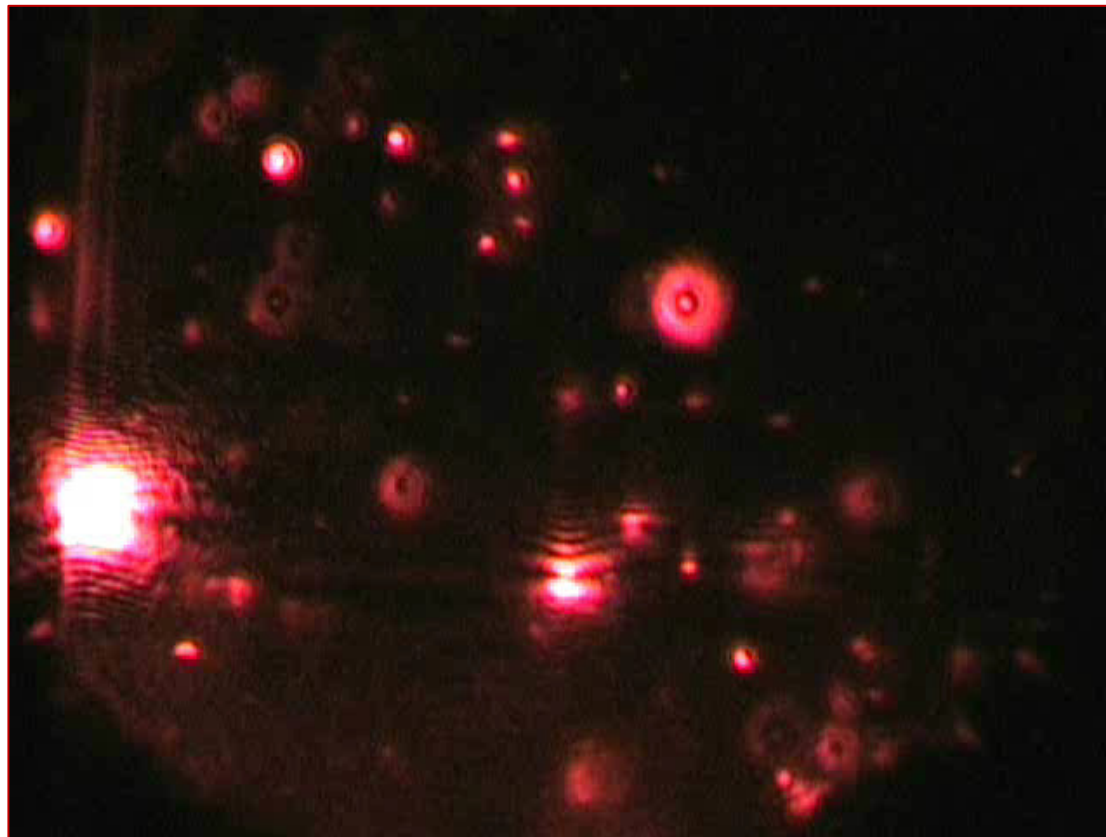


← Miejsce, w którym wiązka lasera pojawia się w próbce.

← Optymalne miejsce obserwacji cząstek – strefa odczytu i analizy.



Natychmiastowa wizualizacja cząsteczek – dwutlenek tytanu



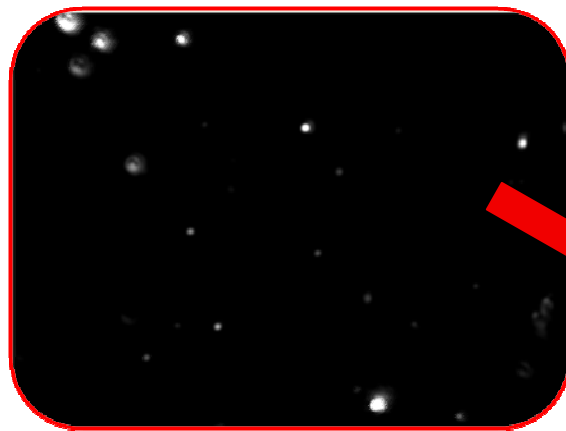
Dwutlenek tytanu (w wodzie)

- Bezpośrednio po wprowadzeniu próbki uzyskać można informacje takie jak: obecność, rozmiar, polidispersyjność i koncentracja nanocząstek
- Ta próbka TiO₂ wykazuje wyraźną polidispersję
- Przedział rozmiaru widzianych cząstek to 60-500 nm

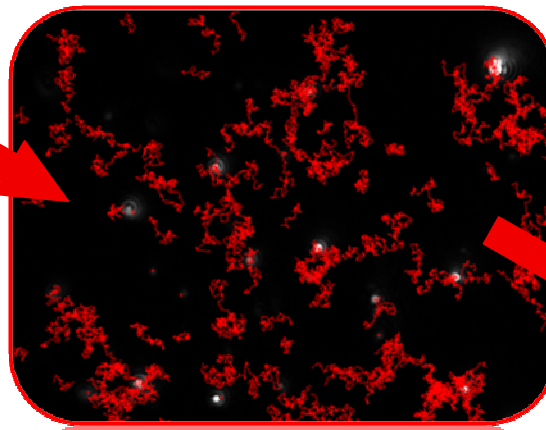


Nanoparticle Tracking Analysis

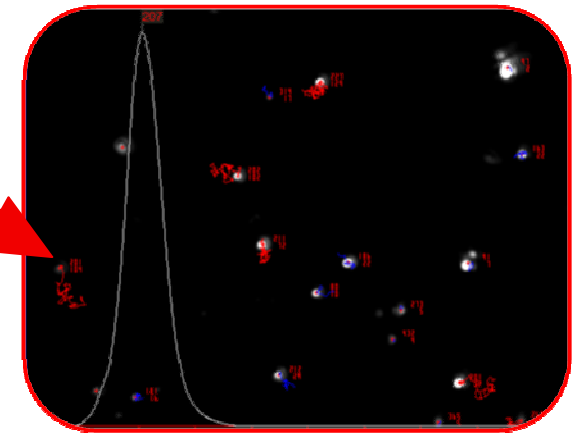
-Analiza Śledzenia Nanocząstek



Capture-nagranie



Tracking-śledzenie



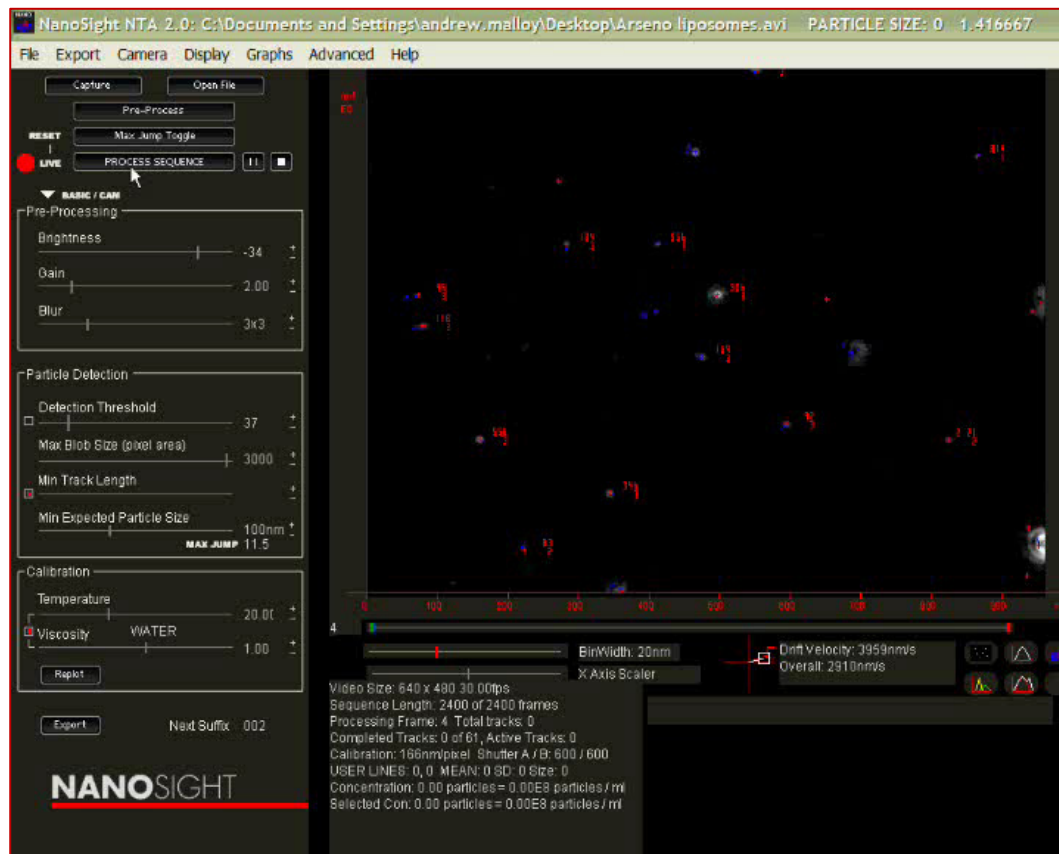
Analysis-analiza

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) mierzy rozmiar cząstek poprzez jednoczesne video-śledzenie wszystkich indywidualnych cząstek

Rezultatem jest wysokiej rozdzielczości rozkład rozmiaru cząstek



Program NTA w akcji



125nm Liposomy są obserwowane i analizowane przez NANOSIGHT NTA 2.0

Informacje o koncentracji i rozmiarze cząstek uzyskiwane są w przeciągu kilku sekund.

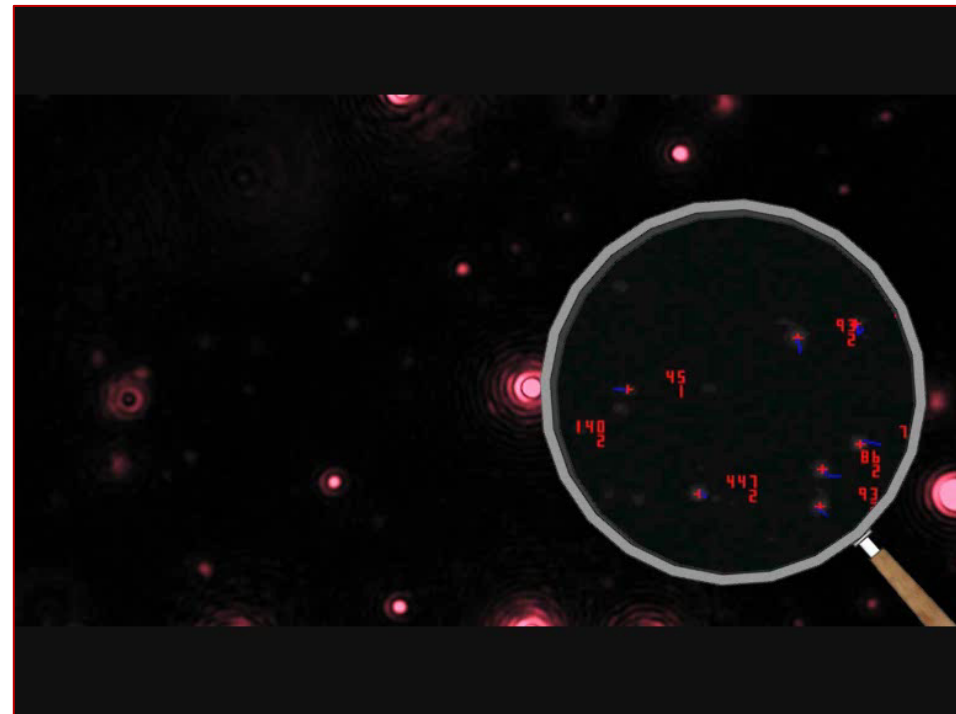
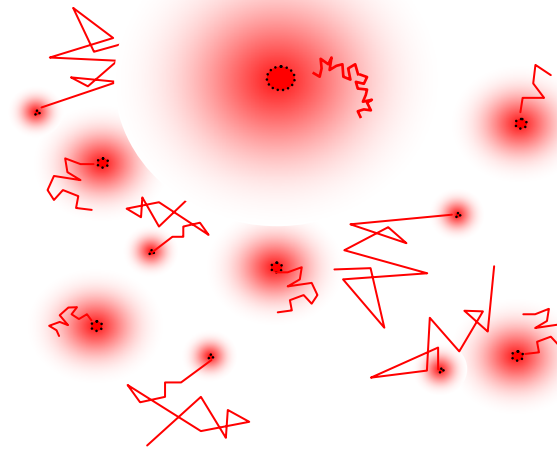
Możliwość obserwacji postępu analizy daje pewność uzyskania stabilności profilu rozmiaru.

System analiz NTA jednocześnie śledzi i analizuje wszystkie cząstki nagrania video, by uzyskać rozkład rozmiaru cząstek



Podstawy pomiaru

- Nanocząstki poruszają się pod wpływem ruchów Browna
- Małe cząsteczki poruszają się szybciej i pokonują dalsze odległości
- Współczynnik Dyfuzji jest obliczony poprzez śledzenie i analizę ruchu każdej cząstki oddzielnie, ale i wszystkich równocześnie.
- Zastosowanie równania Stokesa-Einsteina pozwala obliczyć rozmiar cząstki.
- Właściwości rozpraszania i fluorescencji zostają również mierzone
- Koncentracja/liczba cząstek jest szacowana



Wymiarowanie NANOSIGHT ...jest metodą bezwzględną:

- Ruchy Browna każdej cząsteczki w czasie rzeczywistym są śledzone dzięki nagraniu video.
- Oprogramowanie uzyskuje średni kwadrat przesunięcia w dwóch płaszczyznach = współczynnik dyfuzji (D_t).
- Średnica cząstki (równoważna średnicy hydrodynamicznej), d_h uzyskiwana jest z równania Stokesa Einsteina.
- NTA jest metodą bezpośrednią i nie wymaga kalibracji

$$\frac{\overline{(x, y)^2}}{4} = D_t$$

$$D_t = \frac{K_B T}{3\pi\eta d_h}$$

Równanie Stokesa-Einsteina

K_B = stała Boltzmana

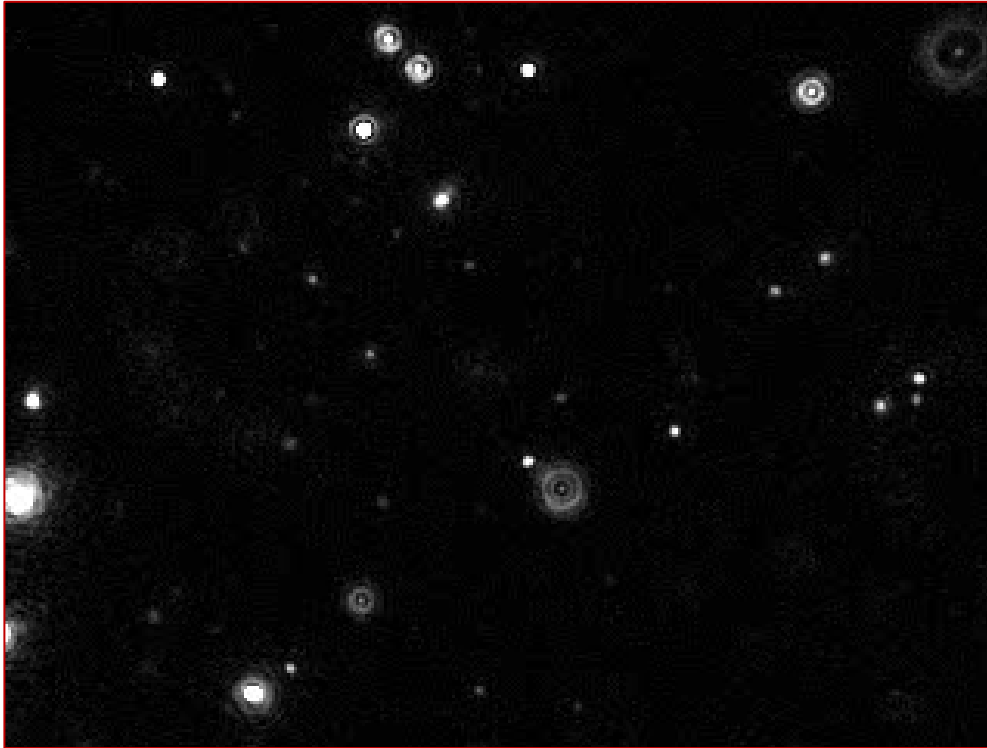
T-temperatura

η = lepkość

d_h -średnica hydrodynamiczna



NanoSight dostarcza wizualizację światła rozproszonego przez cząstki



100+200 nm polistyrenu

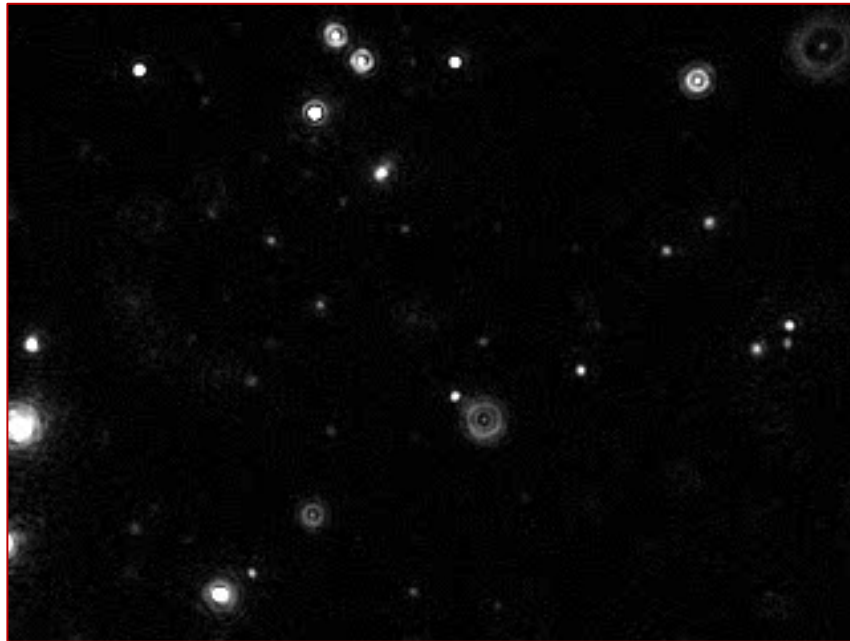
Cząsteczki są zbyt małe by można było zobaczyć przez mikroskop optyczny.

Cząsteczki widziane są jako punkty światła rozproszonego pozostającymi pod wpływem ruchów Browna.

Większe cząstki rozpraszają znacznie więcej światła.

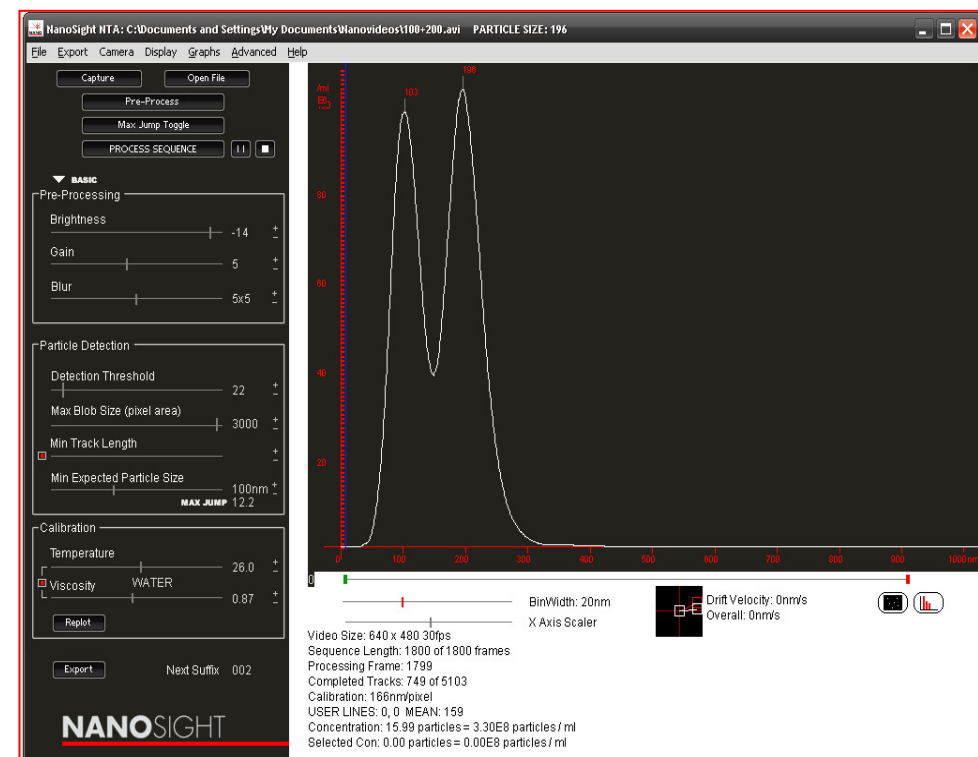


Cząsteczki są zliczane i ich koncentracja jest szacowana



- Mieszanka mikrosfer lateksu 100 nm i 200 nm zdyspergowanych w wodzie w stosunku 1:1

- Rozkład cząstek wyświetlany jest jako ilość vs. rozmiar cząstek.*



*(Not scatter intensity, as DLS)



Limit detekcji NTA

Rozmiar

Najmniejszy rozmiar uzależniony jest od:

- Rozmiaru cząstek
- Typu (materiału)
- Długości i mocy źródła iluminacji (lasera)
- Czułości kamery
- **10 - 40nm**

Max Rozmiar uzależniony jest od:

- Limitowanych ruchów Browna
- **1000-2000nm**

Koncentracja

Min koncentracja związana jest z:

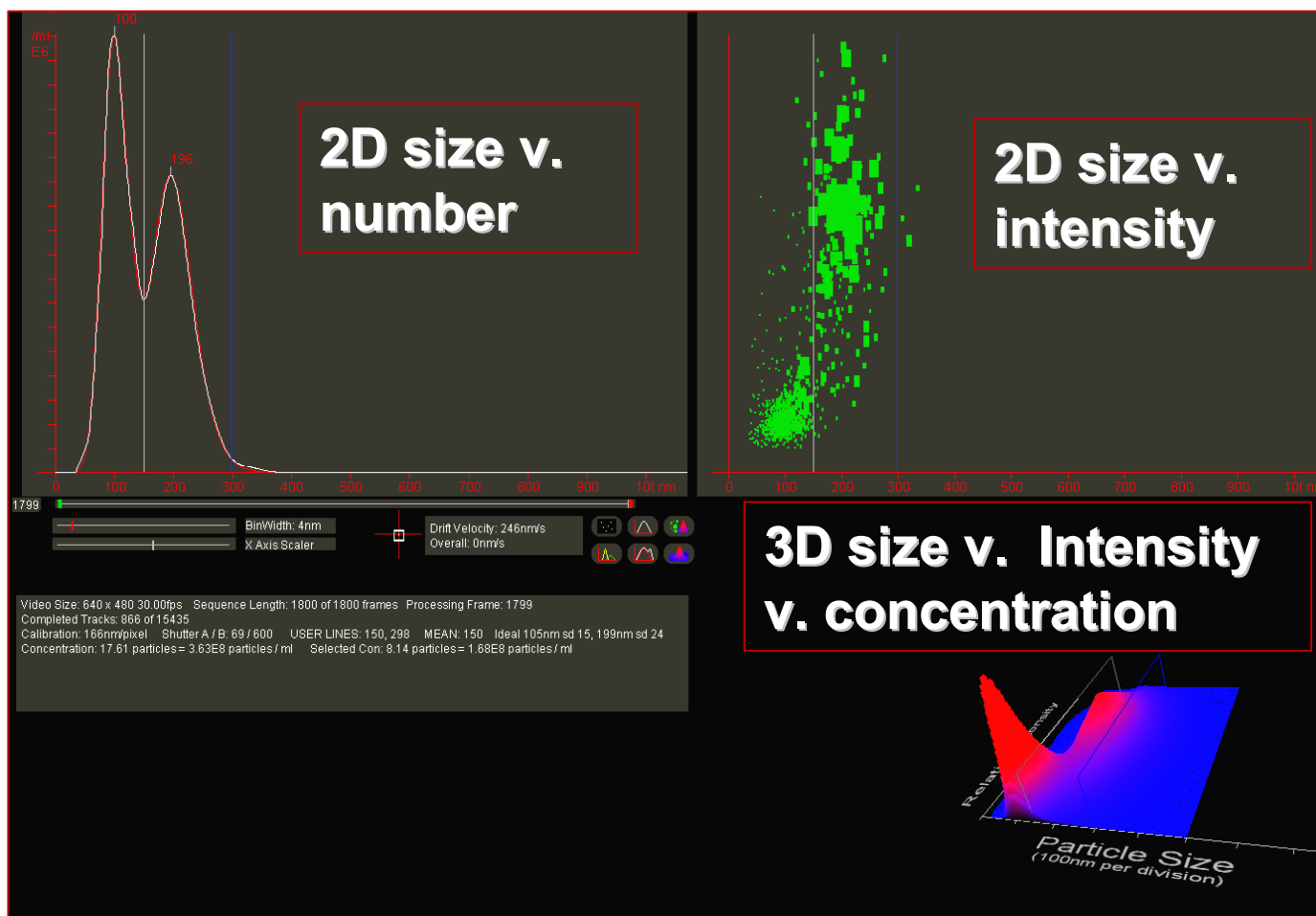
- Słabą statystyką (Wymagającą dłuższego czasu analizy)
- **około $10^6/\text{ml}$**

Max koncentracja związana jest z:

- Niemożliwością rozróżnienia sąsiadujących cząstek
- Krzyżowaniem się ścieżek cząstek
- **około $10^{10}/\text{ml}$**



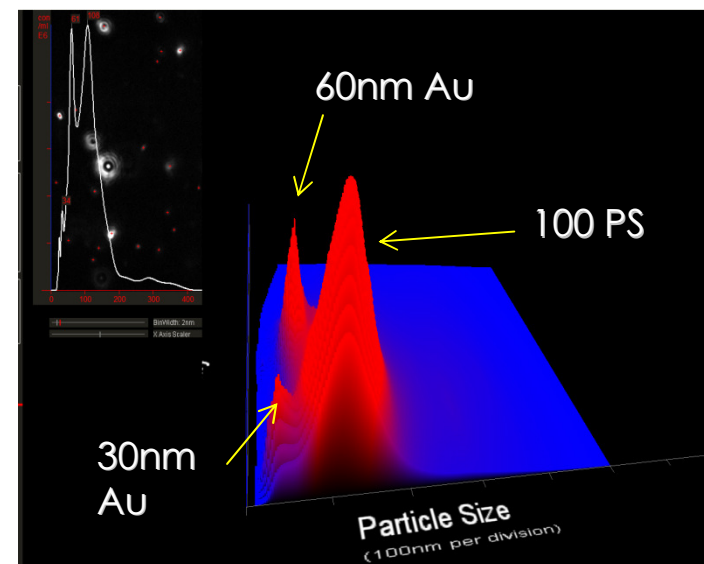
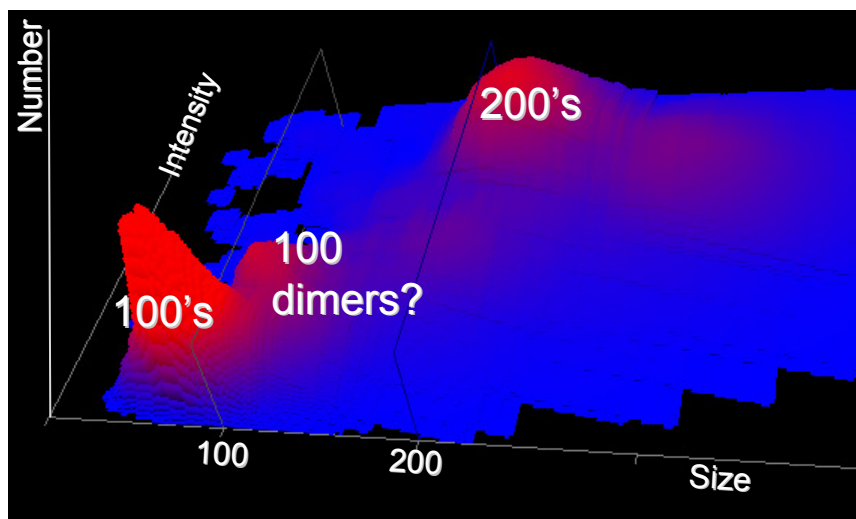
Wykres 3D (Rozmiar Vs. Intensywność Vs. Liczba)



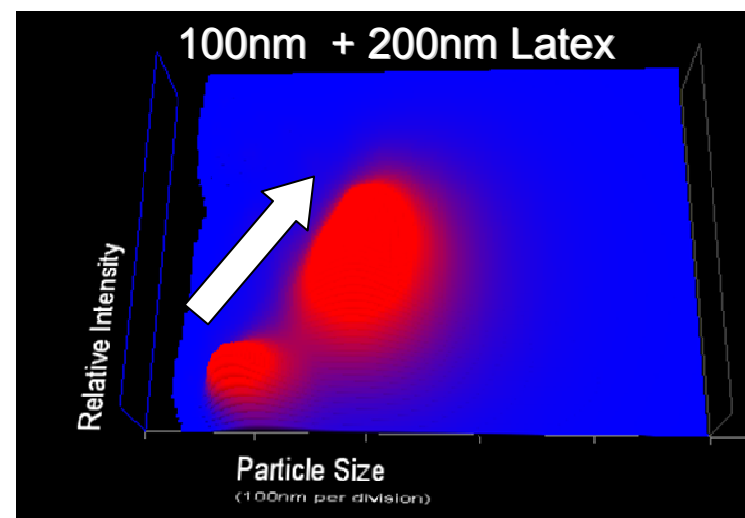
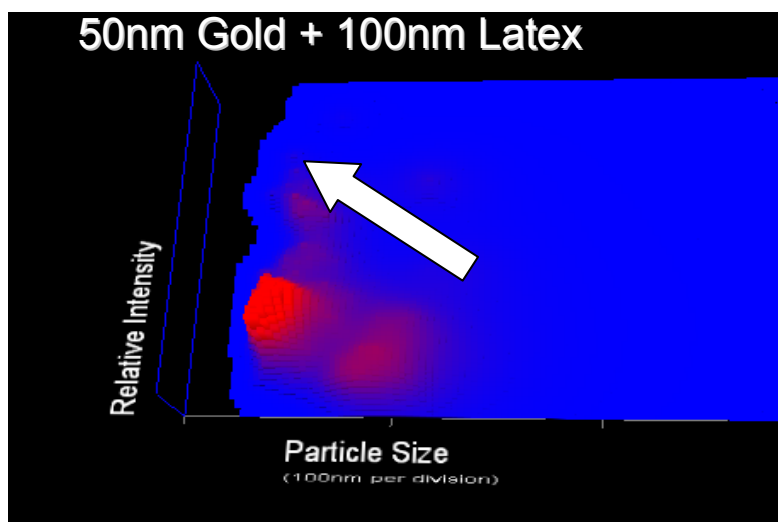
NanoSight posiada unikalną zdolność wykreślenia rozmiaru cząstki jako funkcję jej światła rozproszonego



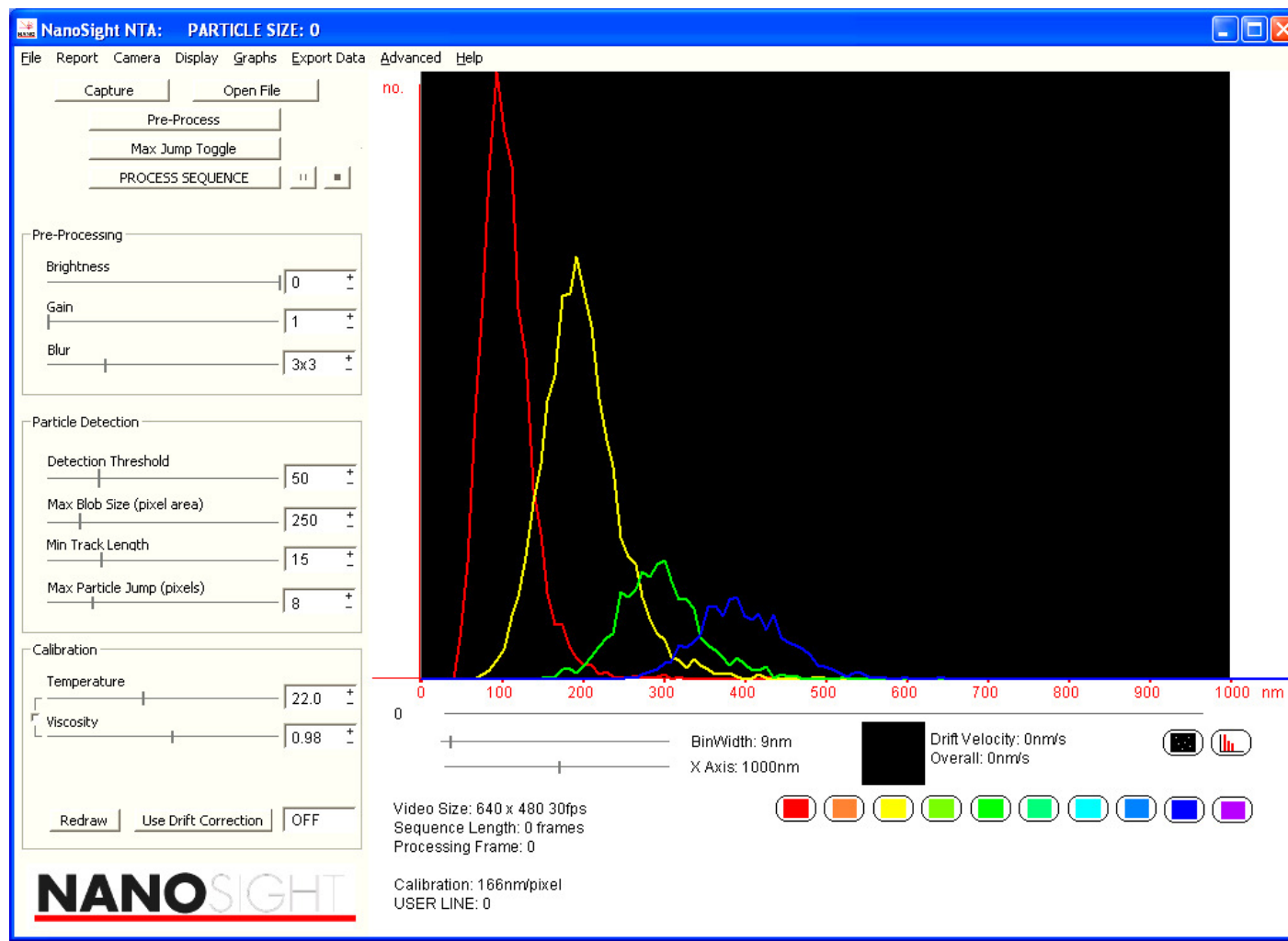
Intensywność rozpraszania – dodatkowa zmienna



Rozróżnianie mieszaniny różnych typów i rozmiarów populacji cząstek



Programowalny pomiar seryjny dla badań związanych z czasem



- Dystrybucja rozkładu rozmiaru w godzinowych odstępach czasu przedstawiająca proces agregacji
- Koncentracja maleje z czasem
- Rozmiar zwiększa się z czasem



Porównując do Dynamic Light Scattering (DLS)

- DLS (znana również jako Photon Correlation Spectroscopy) jest od 40 lat zażyczenie standardową techniką określania rozmiaru nanocząstek

ALE

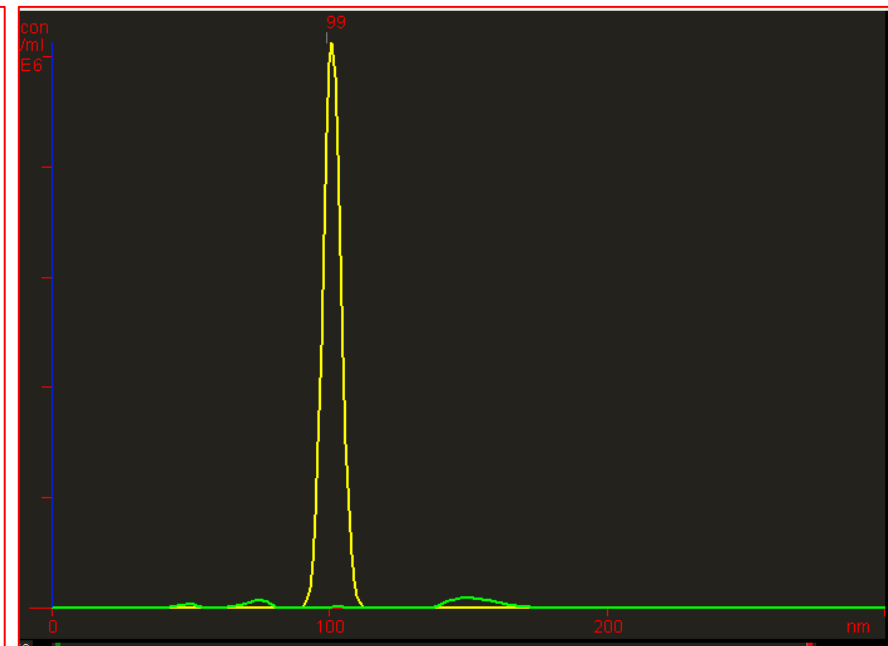
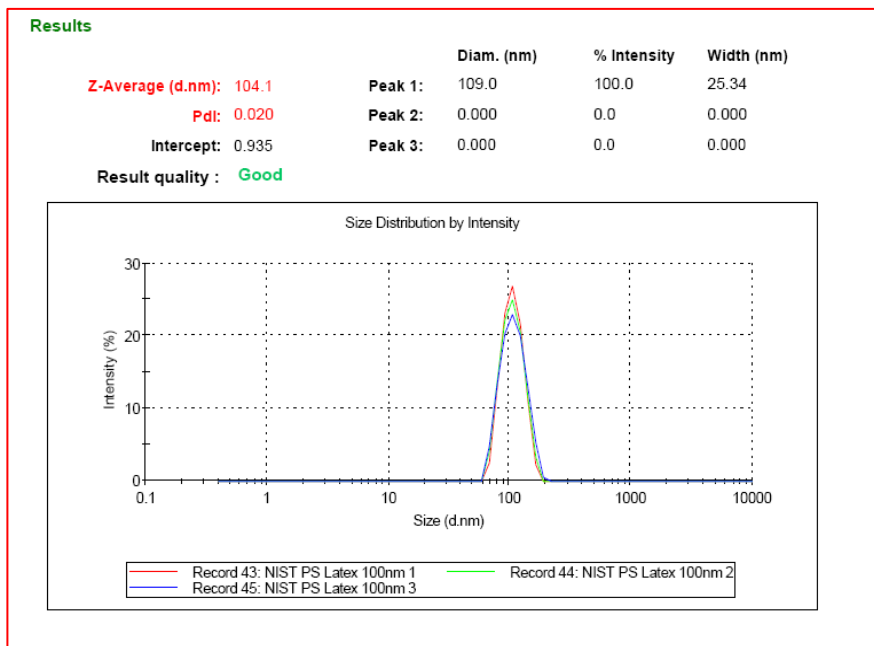
- W systemach polidispersyjnych uzyskiwany jest jedynie średni rozmiar cząstek, silnie przesunięty w stronę największych cząstek.
- Analiza rozkładu rozmiaru cząstek ograniczona do stosunku średnic $>3:1$
- Brak informacji o koncentracji próbki



NTA vs. DLS - Monodispersja

Analiza DLS

NANOSIGHT –podobny wynik
dla systemów mono-
dyspersyjnych

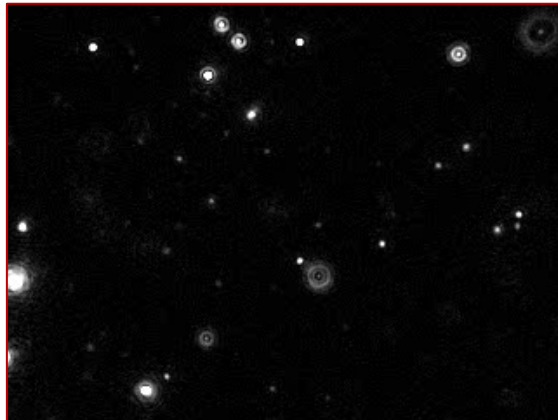


100 nm cząstki polistyrenu w wodzie

NTA – dodatkowa informacja
o ilości nanocząstek!



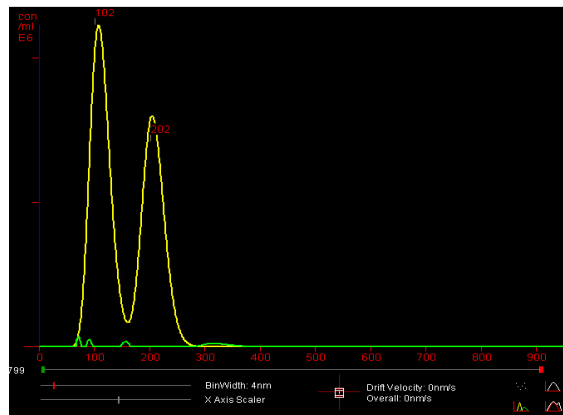
NTA vs DLS – System Bimodalny



Mieszanka cząstek polistyrenu (100 nm i 200 nm)

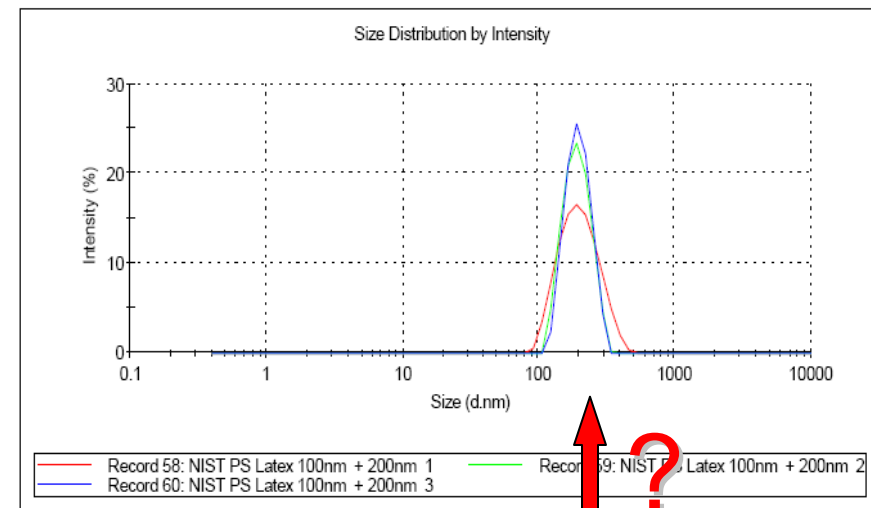
Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 190.4	Peak 1: 197.6	100.0	41.23
Pdl: 0.008	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.944	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



Analiza **NTA** wyraźnie pokazuje obydwa piki 100nm i 200nm

....**detekcja nawet do stosunku średnic 1:1.25**



W przypadku DLS, mniejsze cząstki 100 nm nie zostały wykryte, ponieważ ich obecność została zamaskowana przez silniejszy sygnał pochodzący od większych i jaśniejszych cząstek 200 nm.



Przewaga NANOSIGHT nad PCS:

- Bezpośredni obraz tego, co znajduje się w próbce, potwierdzający dystrybucję rozmiaru.
- Brak odchylenia intensywności światła rozproszonego w kierunku większych cząstek dzięki zliczeniu cząsteczka za cząsteczką
- Dostarczanie informacji o liczbie i koncentracji cząstek
- Wyjątkowo przydatny do analizy systemów polidispersyjnych i mieszanin heterogenicznych
- Nie wymaga informacji o: długości fali i współczynnika załamania światła rozpuszczalnika
- Oprogramowanie NANOSIGHT NTA 2.0 pozwala użytkownikom obserwować formujący się rozkład rozmiaru cząstek w trakcie trwania analizy nagranych odcinków filmowych.
- Trójwymiarowy wykres **liczba vs intensywność vs rozmiar**

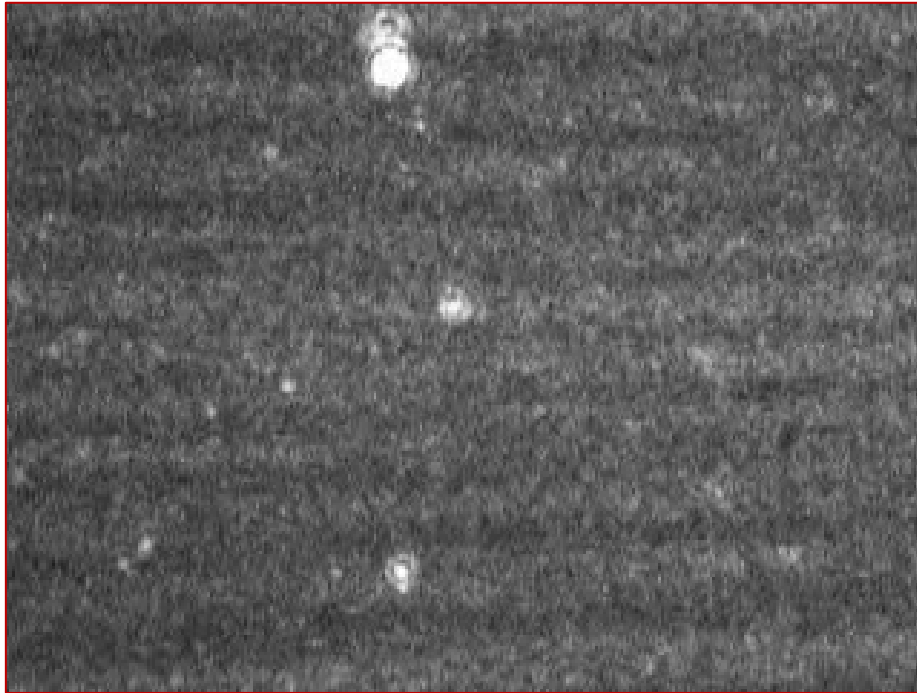


System NANOSIGHT jest szeroko stosowany:

- ✓ Tlenki metali
- ✓ Dodatki paliw
- ✓ Tusze drukarek atramentowych
- ✓ Barwniki i pigmenty
- ✓ QD Drobin Kwantowe
- ✓ Wielo-ścienne nanorurki
- ✓ Polimery i koloidy
- ✓ Kosmetyki
- ✓ Artykuły spożywcze
- ✓ Ceramika
- ✓ Nanobubbles
- ✓ Agregacja protein
- ✓ Wirusy i VLP
- ✓ Liposomy i nośniki w kontrolowanym uwalnianiu leków
- ✓ Bakteriofagi
- ✓ Szczepionki wirusowe



Agregacja Protein



Technologia NanoSight może śledzić agregację protein już od wczesnego etapu, co wykorzystywane jest m.in. w terapii proteinami.

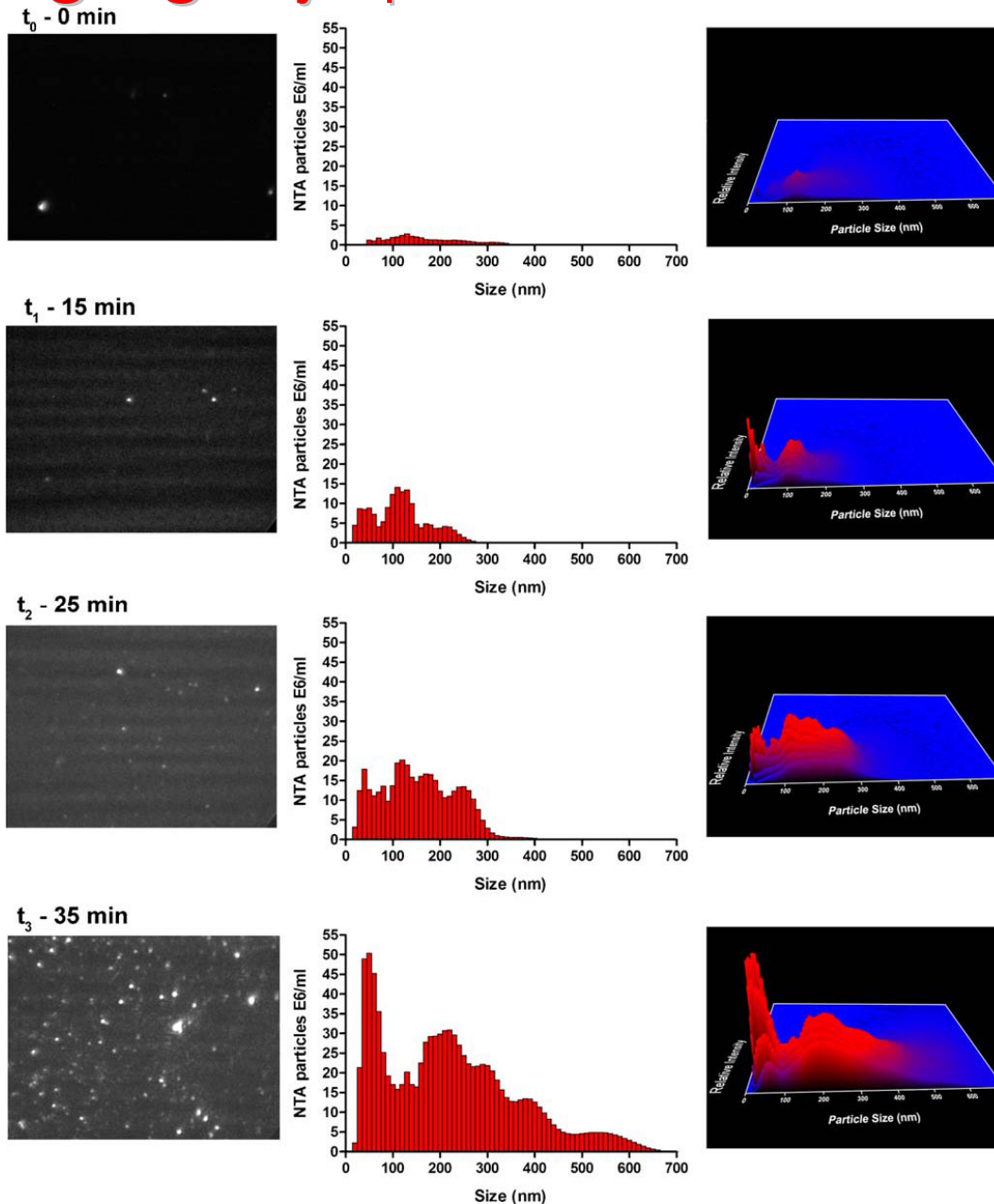
Monomery protein są zbyt małe by można je było rozpatrywać indywidualnie, natomiast ich agregaty są analizowane z łatwością.

NTA - Monomery protein w wysokiej koncentracji powodują zakłócenia tła obrazu, na tle którego widać pojedyncze formy proteinowych agregatów.

Zarówno liczba jak i rozmiar agregatów zostaje obliczona.



Agregacja protein w 50°C

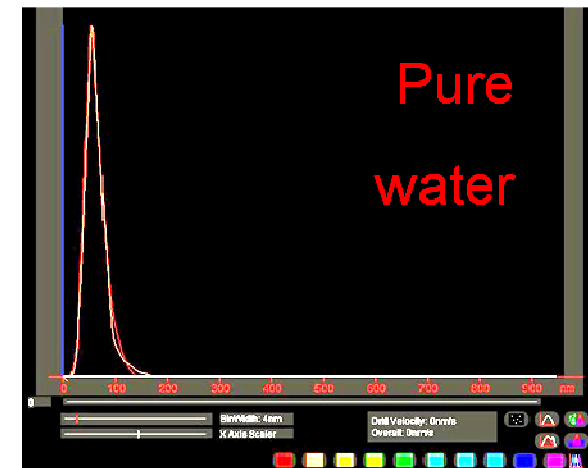
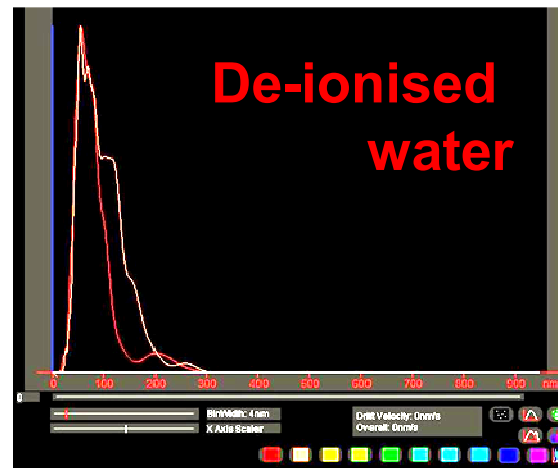
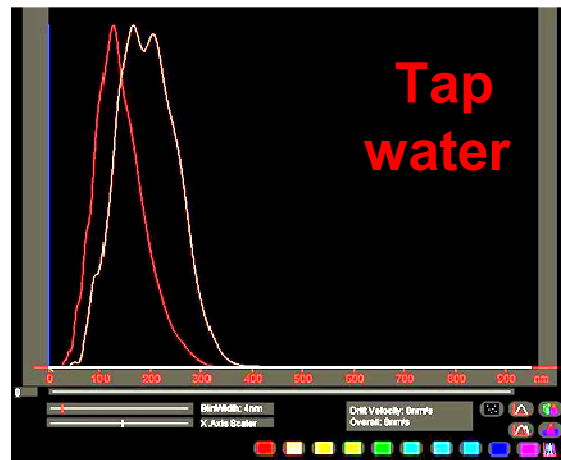


- Technologia NanoSight jest unikalnym narzędziem detekcji wczesnego stadium procesu agregacji w terapii proteinowej
- Monomery protein są zbyt małe dla indywidualnego rozróżnienia przez NTA, natomiast już ich wczesne stadium agregacji jest natychmiastowo wykrywalny.
- Obydwa rozmiar i ilość agregatów jest łatwo kalkulowany dostarczając wgląd w stabilność produktu.

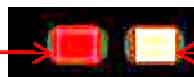
Data reproduced from Filipe *et al* (2010),
Pharmaceutical Research, DOI: 10.1007/s11095-010-0073-2



Chitosan – agregacja w różnych typach wody



Analysis in a first minute



Analysis after 5-10 minutes

Próbka chitozanu została rozcieńczona i przł bezpośrednio po wprowadzeniu próbki oraz po 5-10 minutach.

Woda z kranu: największa agregacja

Woda dejonizowana: agregacja częściowo zredukowana

Ultra czysta woda: brak agregacji

Samples of chitosan nanoparticles (a bioadhesive polysaccharide) developed for use in drug delivery applications (supplied by IPATIMUP - Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto).



Agregacja nanocząstek złota w różnych typach wody

Agregacja 30nm NIST cząstek złota rozpuszczonych w różnych typach wody:

- 18 M Ω ultra czysta woda
- Wode dejonizowana
- Woda z kranu

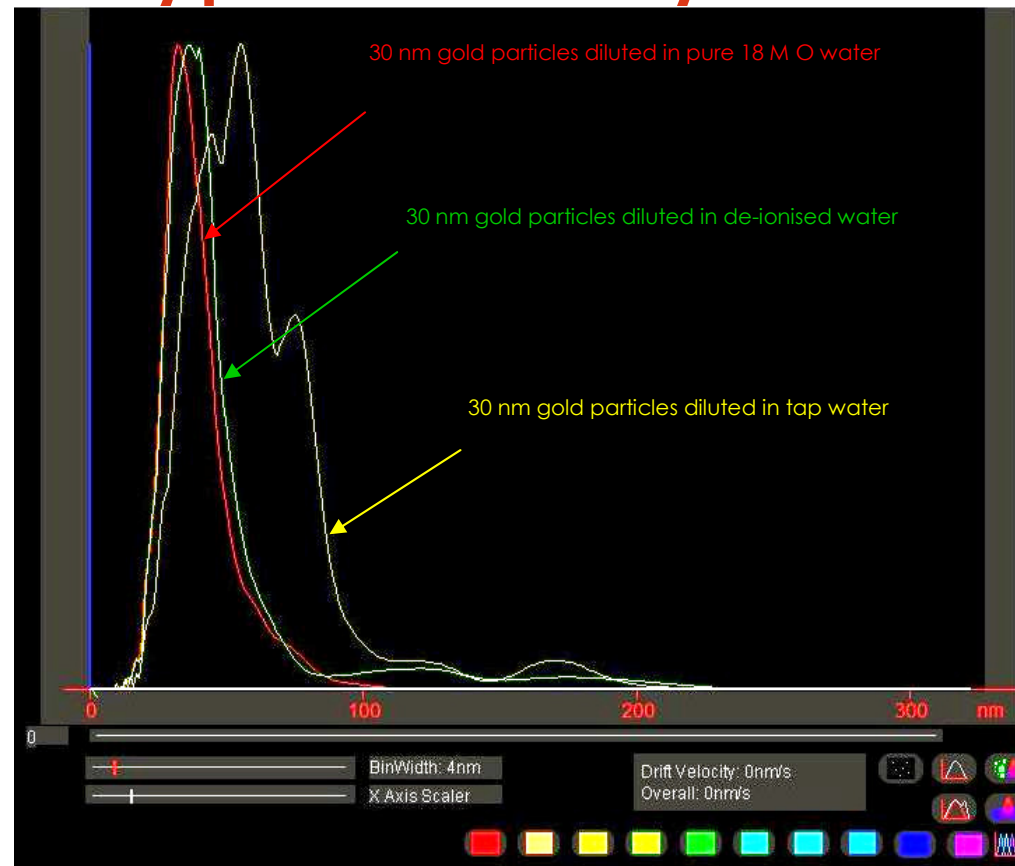


Figure 7: Comparing particle size histogram obtained by NanoSight from a 60 second video of 30nm NIST gold particles diluted in various types of water.



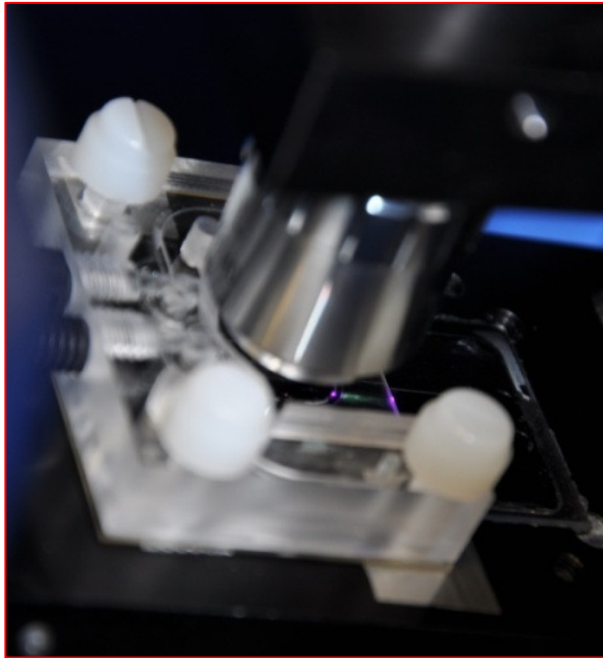
Wybrani użytkownicy:

- BASF, Germany
- BP Castrol, Europe
- Dupont, USA
- Epson, Japan
- Exxon Mobile, USA
- GlaxoSmithKline, Europe
- Merck, USA
- Nestle, Europe
- NIST, USA
- Novartis, Europe
- Proctor & Gamble, USA
- Roche, Europe
- Smith & Nephew, Europe
- Solvay, Europe
- Unilever, Europe
- US EPA
- Wyeth Biopharma, USA

Ponad 250+ urządzeń sprzedanych na całym świecie

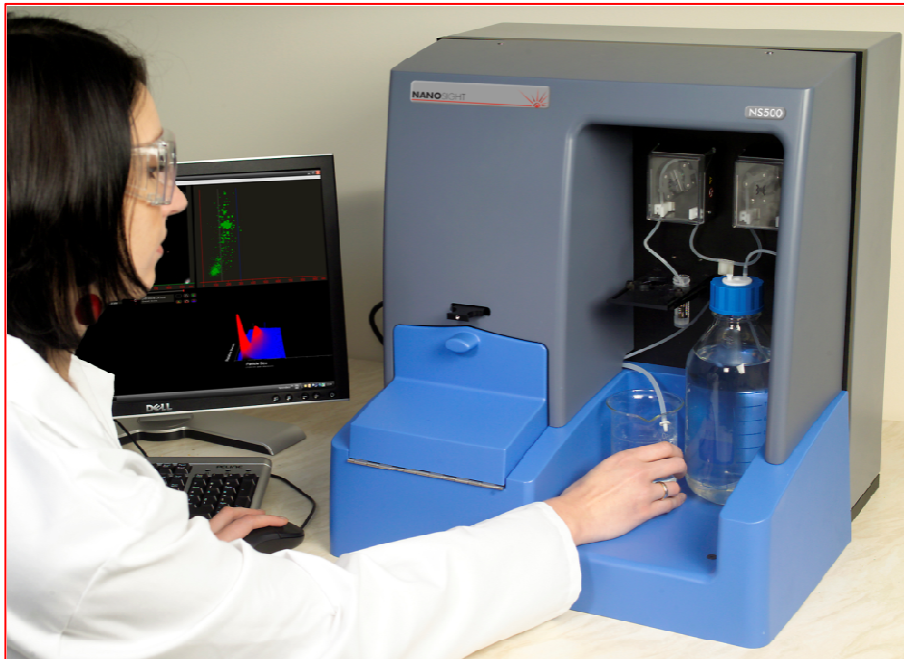
Oraz wiele uniwersytetów i instytucji akademickich



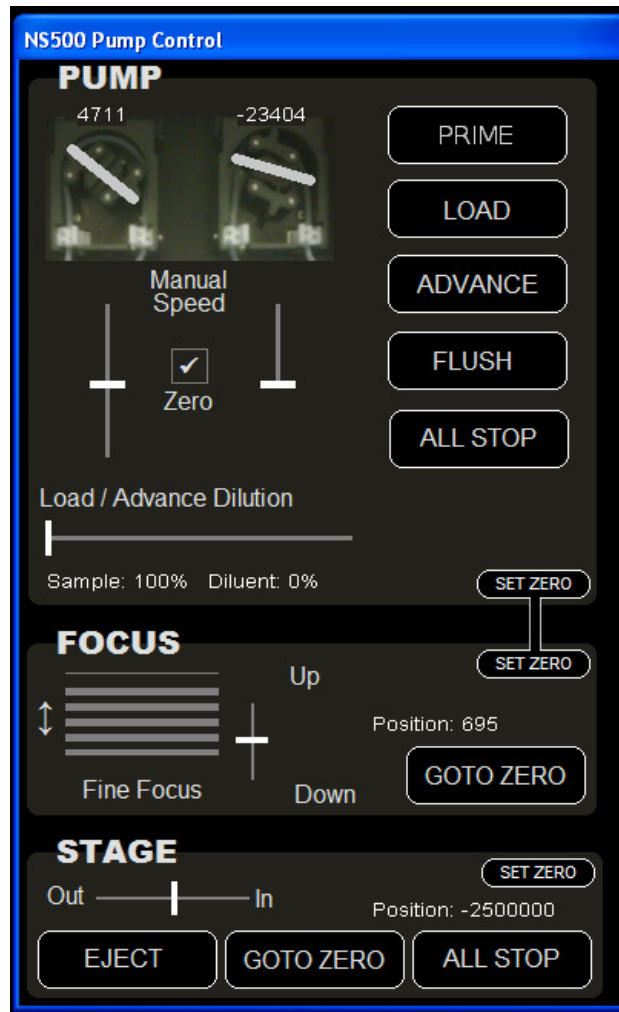
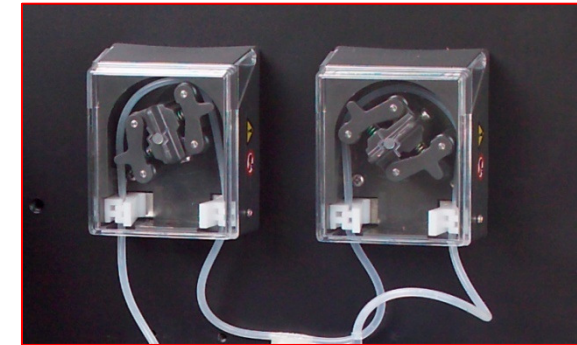


The NanoSight NS500

- Premiera - marzec 2010
- System doprowadzania próbki i rozpuszczalnika
- Przepływowa komora próbki
- Wbudowany panel kontroli temperatury (15-55°C)
- Zmotoryzowana podstawa i fokus



The NanoSight NS500



Nowe oprogramowanie NTA wzbogane o dodatkowe funkcje takie jak:

- Kontrola pracy pomp
- Dozowanie próbki
- Dozowanie rozpuszczalnika
- Autorozcieńczanie próbki
- Oczyszczanie komory próbki
- Sterowanie ostrością
- Pozycjonowanie elementu zawierającego próbkę
- Panel regulacji temperatury
- Script control (skrypt kontroli poleceń) do zaawansowanych poleceń w trybie sekwencji analiz

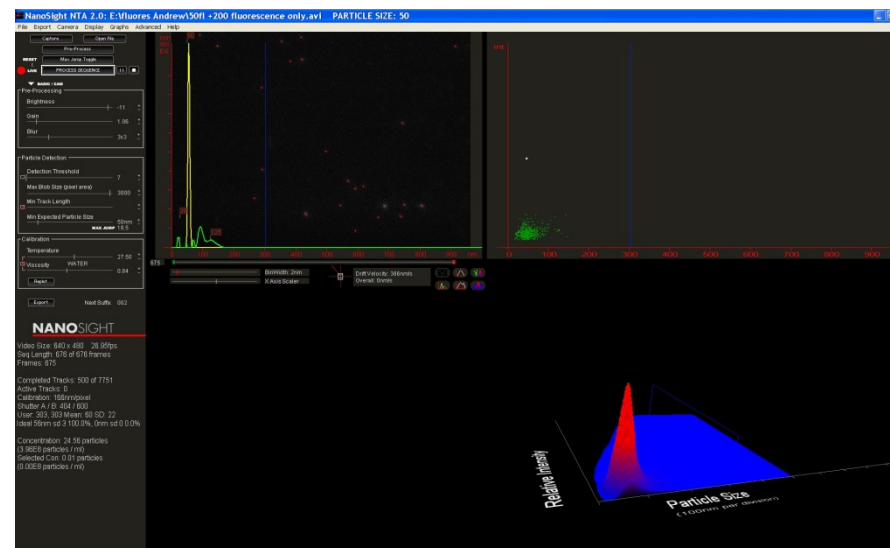
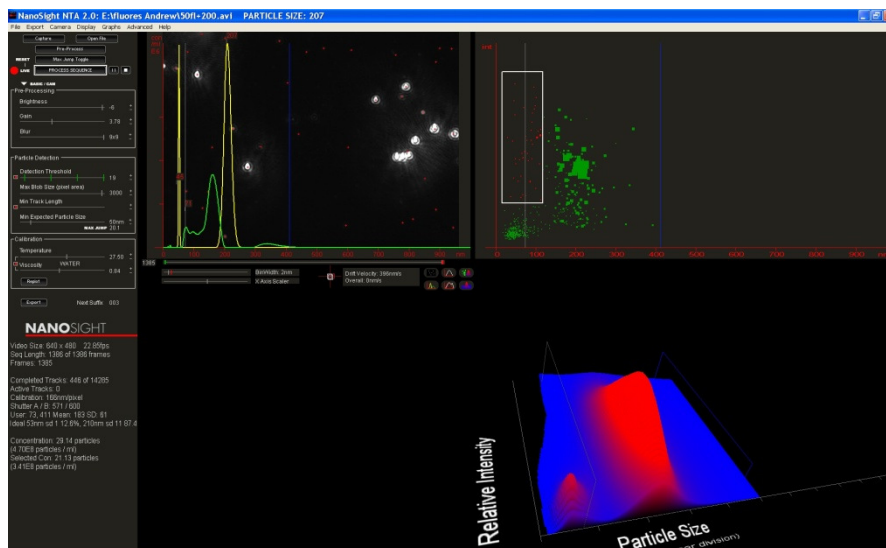


Opcja fluorescencji – już dostępna...

- System NanoSight LM10 lub NS500 może być dodatkowo wyposażony w niebieski (405nm) lub zielony (532nm) laser zdolny wzbudzać odpowiednie fluorofory i quantum dots (kropki kwantowe)
- Zastosowanie odpowiednich filtrów optycznych pozwala analizować nanocząstki o właściwościach fluorescencyjnych.
- Zastosowania:
 - Badania toksyczności nanocząstek
 - Bio-diagnostyka



Detekcja cząstek fluorescencyjnych w mieszaninie



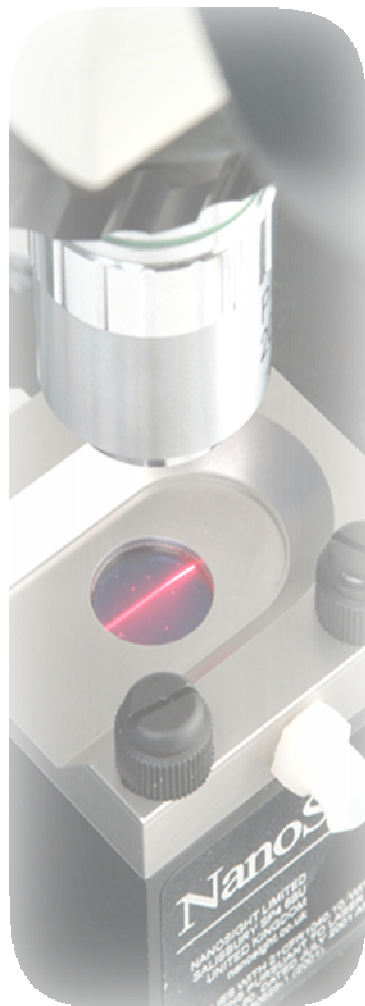
Mieszanina cząstek 50nm
fluorescencyjnych i 200nm nie-
fluorescencyjnych
zanalizowanych w trybie światła
rozproszonego

Oba rodzaje cząstek zostały
wykryte i zanalizowane

Ta sama mieszanina widziana po
usunięciu światła rozproszonego
poprzez zastosowanie
odpowiedniego filtra optycznego
(fluorescencyjny)



NANOSIGHT



Nanoparticle Tracking Analysis:

Sizing, Counting and Visualising of
Nanoparticles

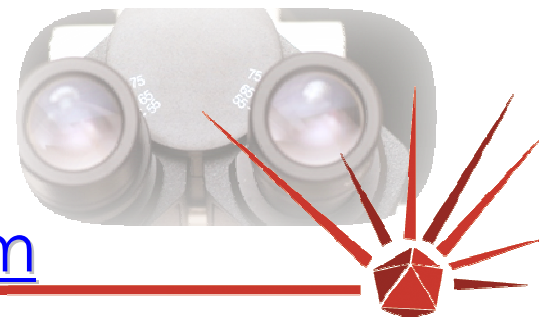
Dziękuję za uwagę !!!

NanoSight Ltd
Minton Park,
London Road,
Amesbury,
Wiltshire
SP4 7RT
United Kingdom

Email: admin@nanosight.com

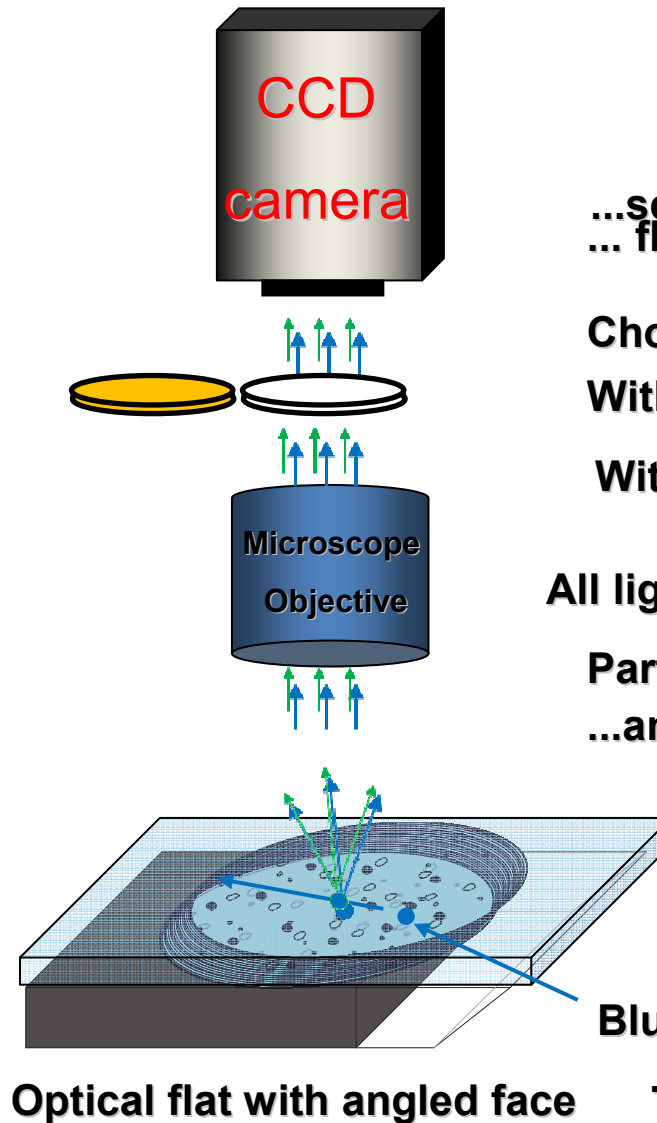
Tel :+44 (0)1980 676060

Fax :+44 (0)1980 624703



www.nanosight.com

Fluorescent Measurement



...scatter dominant and imaged onto CCD
... fluorescence imaged onto CCD

Choice of clear or fluorescent filter:

With clear filter, all light transmitted

With fluorescent filter, scattered light blocked

All light collected by objective...

Particles scatter the laser beam...

...and if fluorescent will also fluoresce

Thin film of sample...

... containing suspended particles

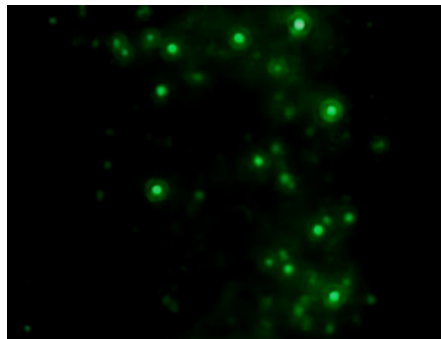
Blue laser beam illuminates optical flat...

...and transmits through the sample



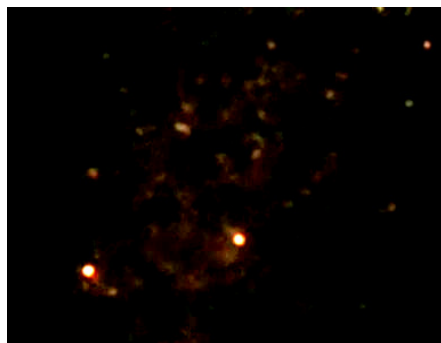
Wykrywanie fluorescencji w płynach biologicznych

Example of analysis of cellular micro- and nano-vesicles labelled with an appropriate fluorescent antibody.



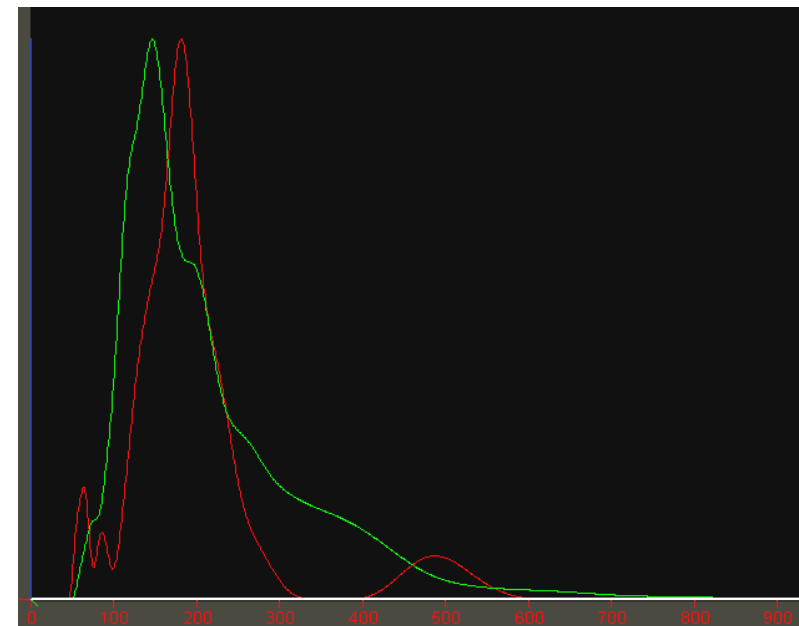
Light scatter

Światło
rozproszone



Antibody
Fluorescence

Antyciała
fluorescencja



Profil dystrybucji rozkładu rozmiaru próbki (znormalizowany) w trybie wiata rozproszonego (zielona linia) i fluorescencji (czerwona linia).



Quantum Dots Particles

Video shows **fluorescent quantum dots**

Fluorescence

Filter removed

Scatter from
particles

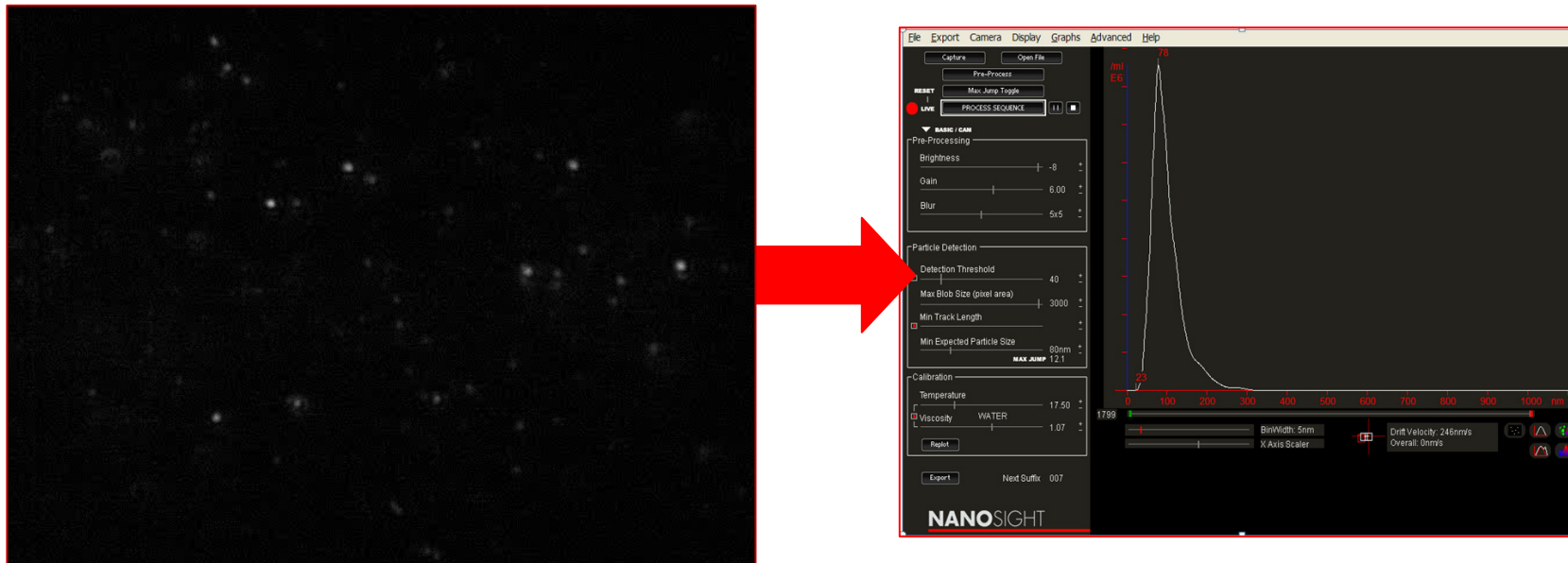


Agregacja w różnych typach wody

- Dilution in Different Quality Waters In this example, two nanoparticle sample types (chitosan nanoparticles and gold calibration nanoparticles) were diluted in waters of varying quality.
- 1. Tap-water (from hard-water area)
- 2. Deionised water (for use in batteries)
- 3. High purity, reagent grade (18M Ω) water



Drug Delivery - System dostarczania leków



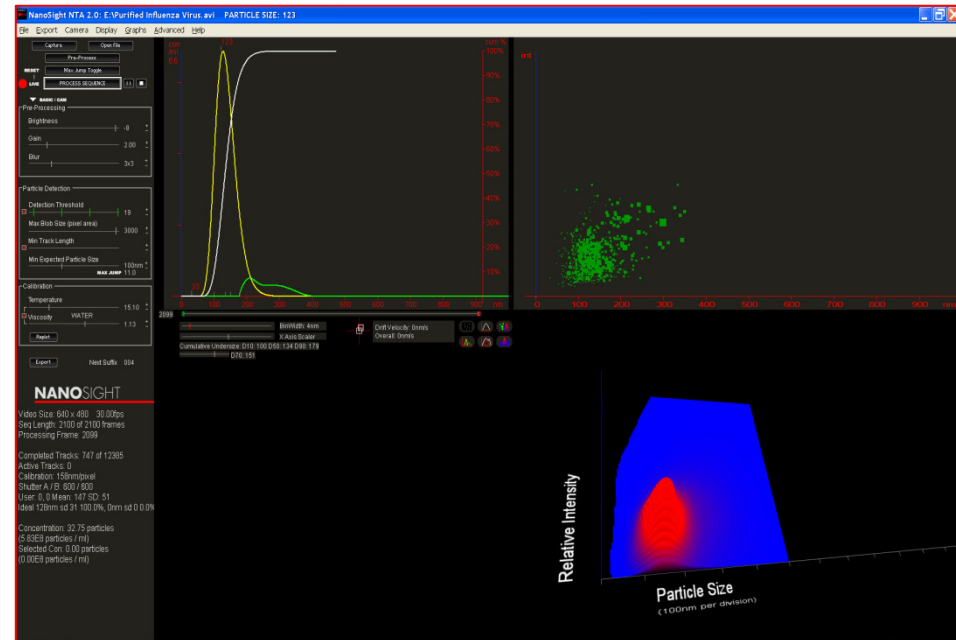
Powyżej pokazane są liposomy używane w systemie dostarczaniu leków.

Możliwość dostarczenia leku do odpowiedniego miejsca w ciele ludzkim pozwala na dostarczenie odpowiedniej koncentracji leku w odpowiednim czasie.

Również inne formy dostarczania leku do organizmu, takie jak wektory wirusowe czy degradowalne nanocząstki polimerowe mogą również zostać poddane analizie NS.



Oczyszczony wirus Influenza

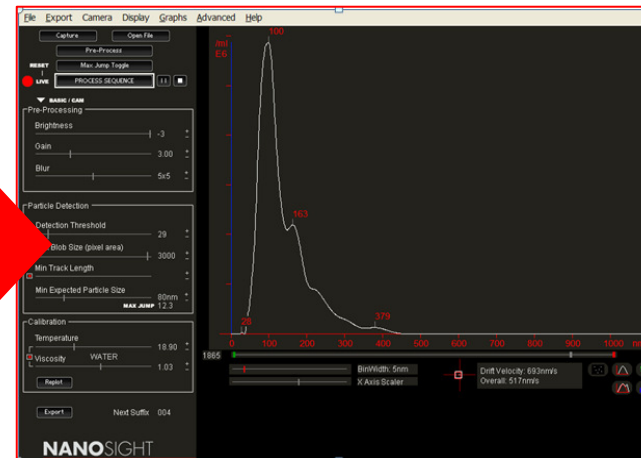
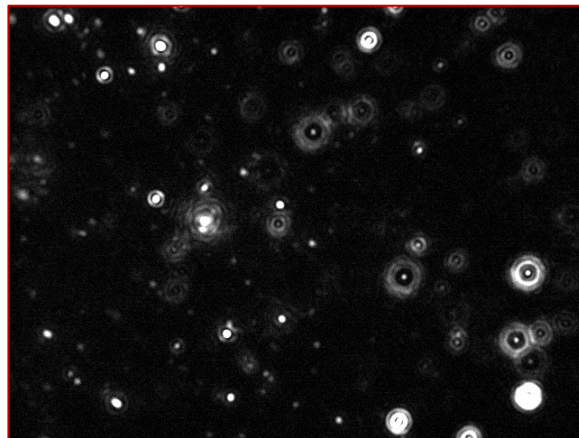


Możliwość zliczenia wirusów znajdujących się w suspensji jest niezbędne dla tych, którzy pracują przy produkcji szczepionek.

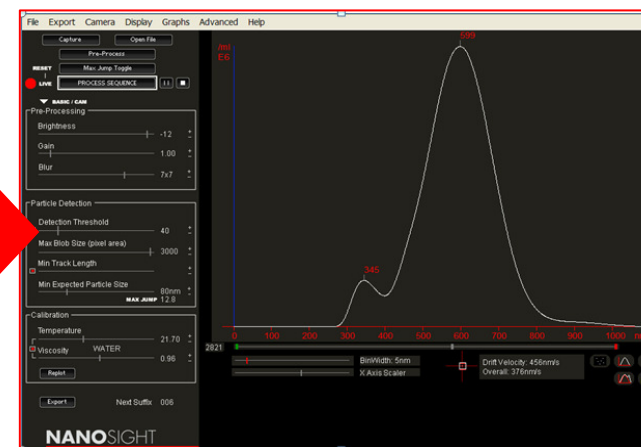
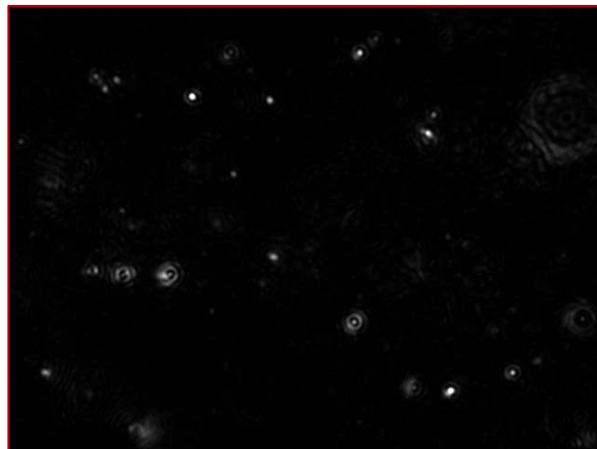
Obecne metody do zliczania wirusów, takie jak plaque assay zliczają tylko zainfekowane cząstki, które często reprezentują tylko pewną część całej populacji szczepionki, która może zawierać również atenuowane drobnoustroje i.e. Być może tylko 1% produktu pozostaje infekcyjny.



Przykład 4 – zużycia ortopedyczne



Zużyte drobiny
CrN



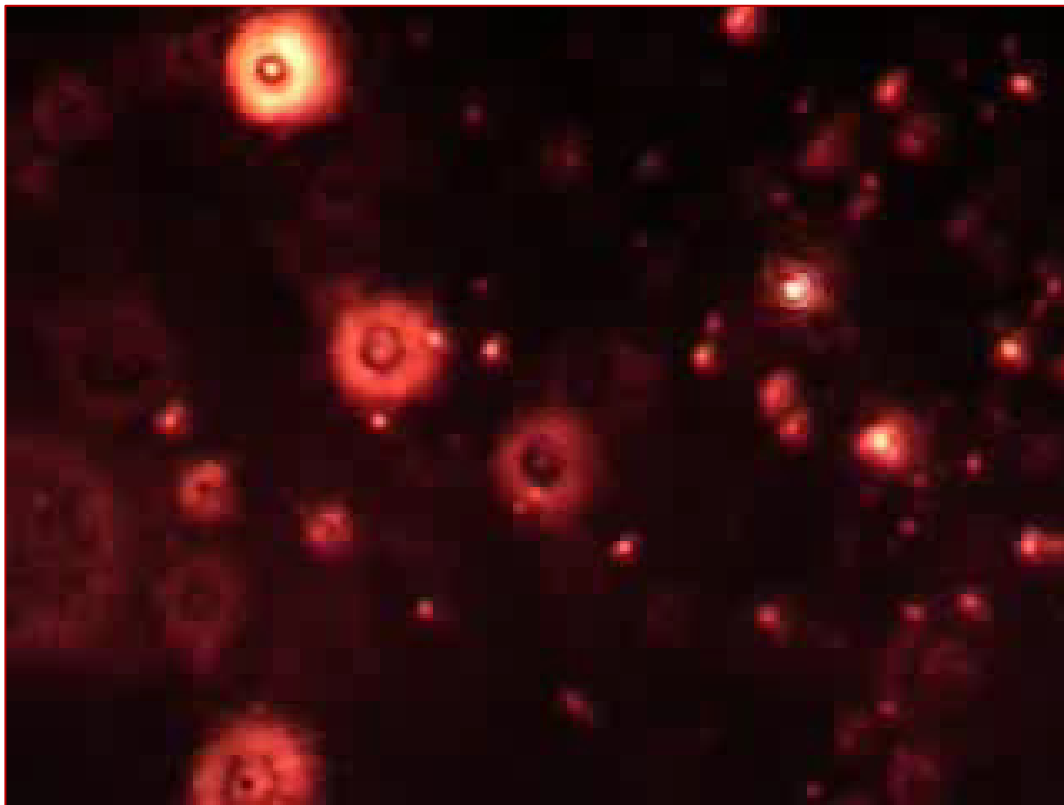
Zużyte drobiny PE

Implanty ortopedyczne w miarę upływu czasu ulegają zużyciu uwalniając dużą ilość materiału implantacyjnego do otaczających tkanek, co nie pozostaje bez wpływu na organizm. Większość rozsianych cząstek zużycia protez jest mniejsza od 1 mikrona w przypadku protez polimerowych i nie większych niż 0,5 mikrona przy użyciu ceramiki.

Kształt, rozmiar i ilość wydzielonych cząstek jest istotna przy otrzymywaniu coraz nowszych i lepszych materiałów implantacyjnych.



Przykład 6 – tlenek cynku w toluenie

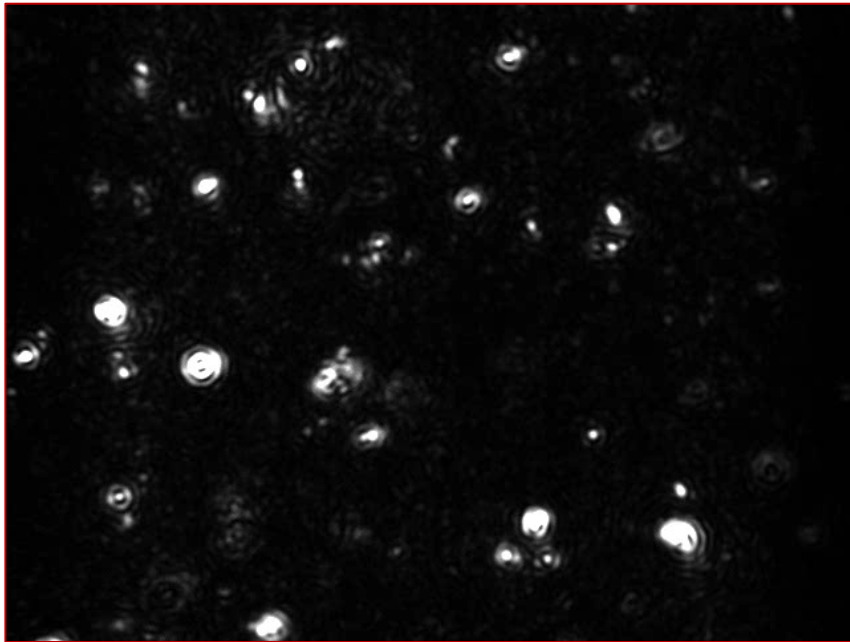


Tlenek cynku w toluenie

NANOSIGHT może działać w szerokim zakresie rozpuszczalników.



Przykład 7 – Obecność bakterii w próbce



Bakteria nie porusza się pod wpływem ruchów Browna.

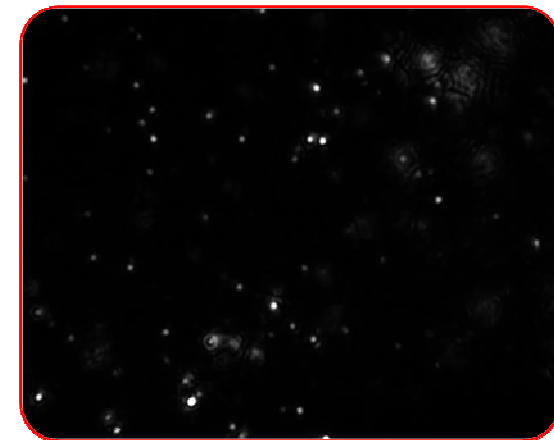
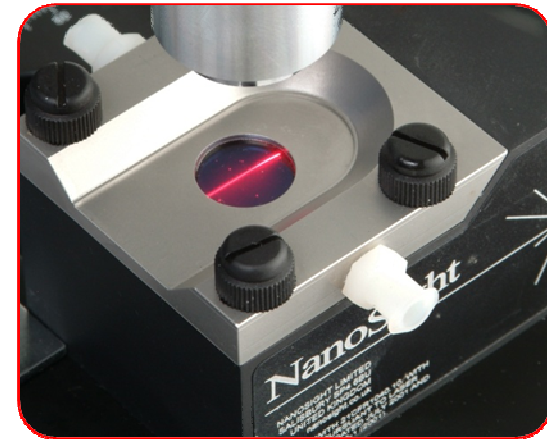
Oprogramowanie NTA jest w stanie śledzić wektor ruchu cząstek, które poruszają się ruchami innymi niż ruchy Browna.

Może to znaleźć zastosowanie w śledzeniu ruchów “nano-motorów” lub “nano-pływaków”, gdzie szybkość poruszania się cząstek może być powiązana z tempem reakcji katalitycznej pojawiającej się na powierzchni cząstki etc.



NanoSight - Podsumowanie

- ✓ Rozkład rozmiaru cząstek o wysokiej rozdzielczości poprzez detekcję i analizę pojedynczych cząstek
- ✓ Wizualizacja cząstek do 10 nm, zależnie od materiału cząstek
- ✓ Dostarczanie danych liczby i koncentracji próbki
- ✓ Jednoczesny pomiar światła rozproszonego i fluorescencji
- ✓ Minimalne przygotowanie próbki
- ✓ Rzeczywisty czas informacji
- ✓ Śledzenie procesów real time takich jak agregacja
- ✓ Szybkie rezultaty



The **NANOSIGHT** LM10 Family



The **NANOSIGHT** LM20

Description

Compact, low footprint version of the NanoSight technology in which the optics are contained within a customised housing for ease of use.

Using the normal LM12 laser module, this instrument generates identical results to that obtained with the LM10 General Purpose instrument. Can be run in Extended Dynamic Range (EDR) mode for very polydisperse systems.



Uses

Typically suitable for polydisperse particles above 25nm (50nm for proteinaceous samples):

- For use in a non-laboratory environment
- For use by non-expert users unfamiliar with microscopes
- For conventional inorganic (ceramic, metal, metal oxide) >25nm nanoparticle suspensions
- Larger >40-50nm polymeric/biological nanoparticles (e.g. most viruses)

Typical Customers

- Inks, paints and pigment manufacturers
- Chemical and petrochemical industries
- Foodstuffs, cosmetics and pharmaceutical nanoemulsion manufacturers

Upgrade Potential

- Blue laser for more scattering from smaller, lower Ri particles
- Temperature control: 15 - 55degC



The **NANOSIGHT NS500**

~~3ml~~



Description

An integrated, top-of-the-range, multifunctional instrument featuring;

- Twin-pump fluidics control for automatic sample loading, washing and dilution + replaceable lines
- Computer-controlled motorised optical stages for ease of beam location and focussing as well as automatic sample cell scanning for improved statistics
- Fully programmable temperature control of sample
- Choice of laser wavelength
- Choice of camera type (conventional CCD or high sensitivity EMCCD)
- Choice of fluorescent filters to match wavelength and fluorophore
- Customised housing for ease of use
- Programmable operation from within NanoSight NTA 2.0 programme installed on controlling computer

Uses

- Analysis (presence, size distribution, concentration, fluorescence) of nanoparticles of all types from 10nm to 1000nm (depending on instrument configuration and sample type)
- Programmable sampling of, for instance, reactors/lines over extended time periods at user defined intervals

