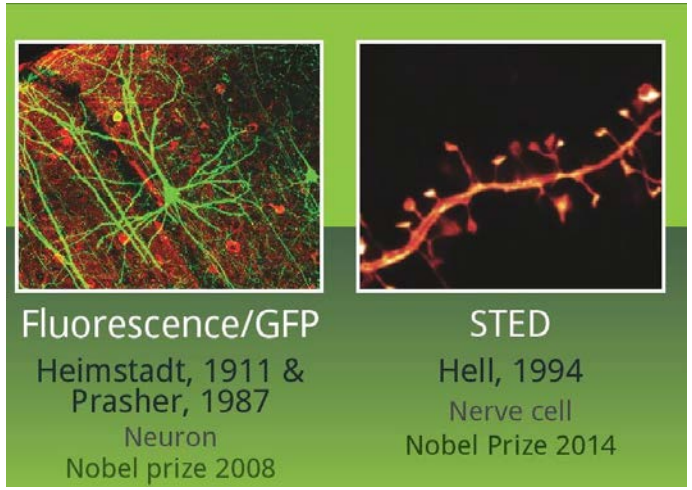
3D Cell Explorer

1. Введение
2. Примеры применений
3. Программное обеспечение и совмещение с инкубатором

Введение

Рельеф живой клетки

Флуоресцентная микроскопия например STED



‘Живая клетка’ ограничения

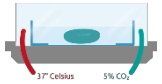
Ограничения:

- Генетическая модификация
- Выцветание образца
- Фототоксичность

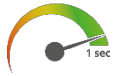
Технология Nanolive, например 3D Cell Explorer

Без маркеров

∞Живая клетка



Совместимость с инкубатором



3D за сек

Измерение коэф-тов преломления

Исследуйте таинственный клеточный мир благодаря количественной 4D-долговременной визуализации живых клеток!

Микроскопия без маркеров например, фазовый контраст

‘Исследования’ ограничения

Ограничения:

- Неспецифичный
- Не количественный
- Не функциональный

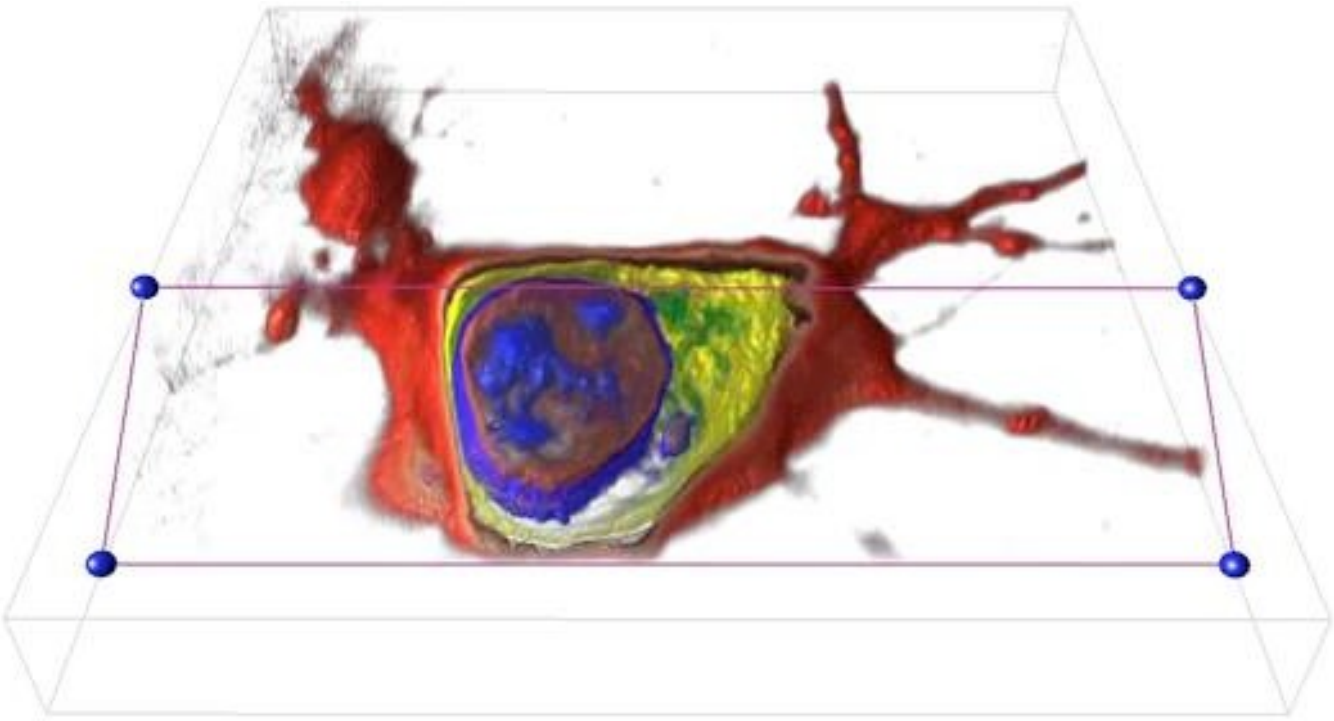
®Nanolive SA
2014-2017

Введение

Как это всё началось

3D Cell Explorer

- Без маркеров
- ∞Живые клетки
- Совместимость с инкубатором
- 3D за сек
- Измерение коэф-тов преломления



Cotte et al., **Nature Photonics 7,** 113-117 (2013)

®Nanolive SA
2014-2017

3D Cell Explorer

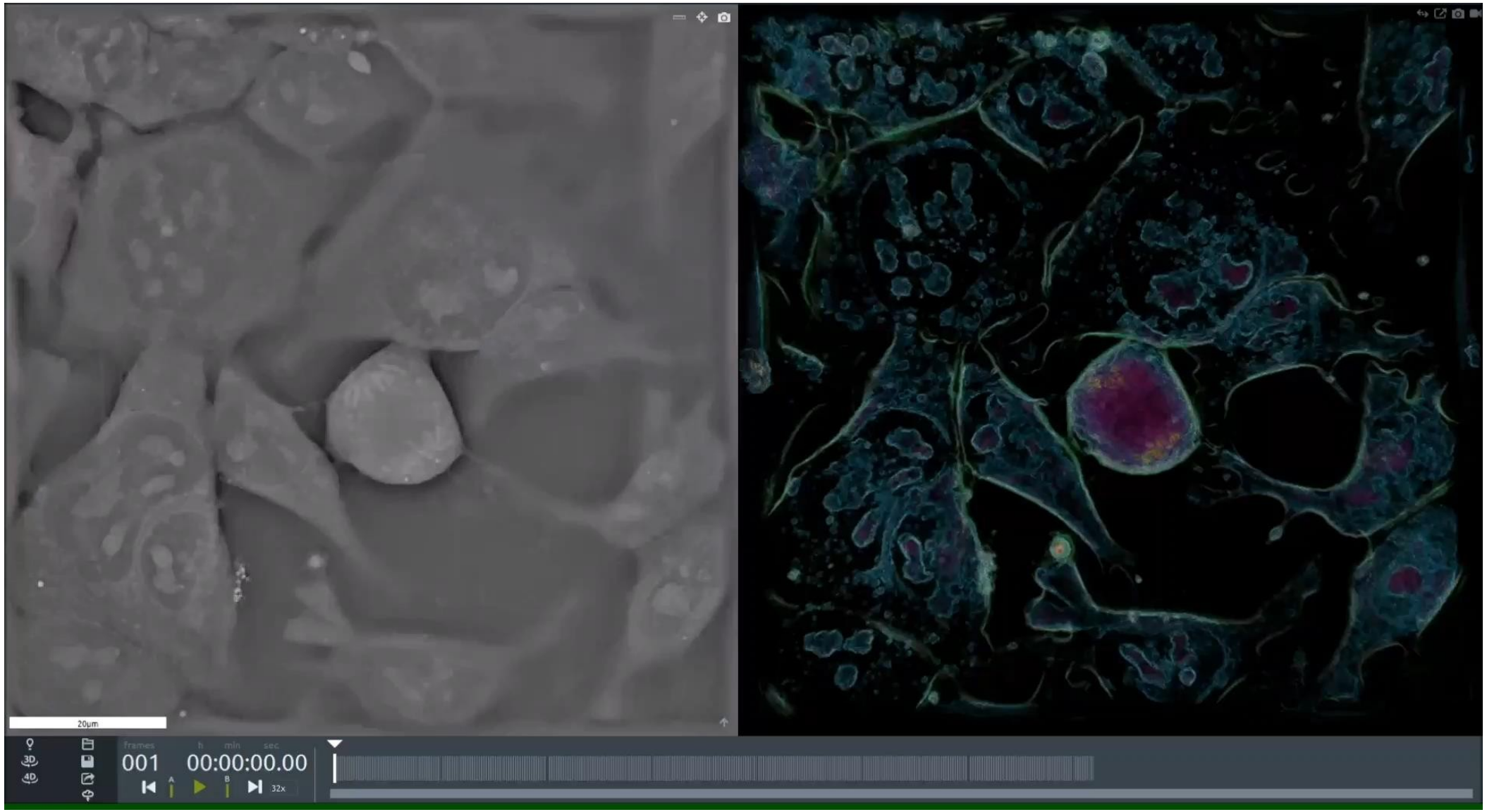
1. Введение
2. Примеры применений
3. Программное обеспечение и совмещение с инкубатором

3D Cell Explorer

1. Введение
2. Примеры применений
   - Анализ деления клеток
   - 3D Клеточные культуры
   - Мониторинг межклеточного взаимодействия
   - Исследование гибели клеток
   - Цитология и гистология
3. Программное обеспечение и совмещение с инкубатором

Изучение деления клеток

Митоз

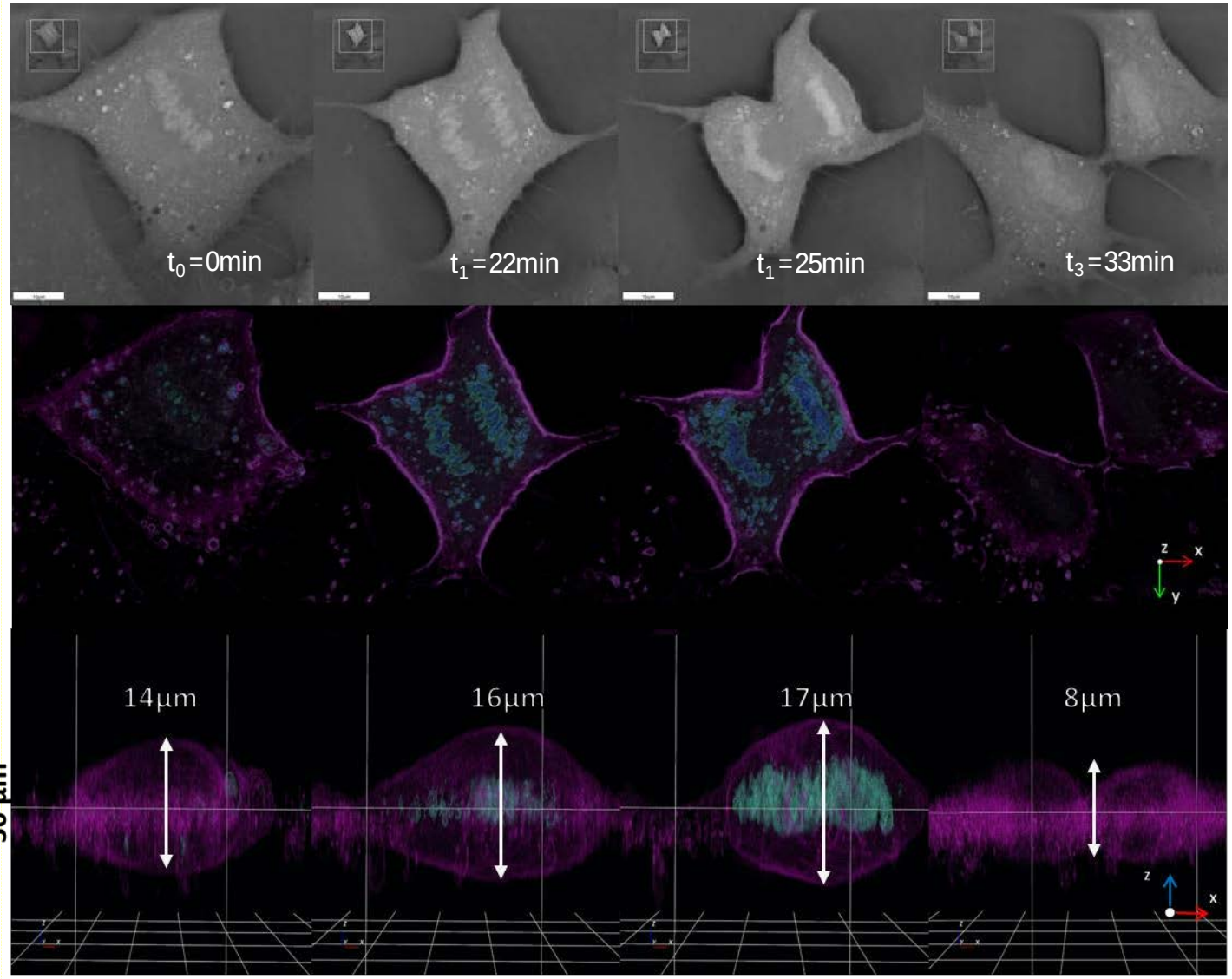


Chromosomes- Mitotic cells

®Nanolive SA
2014-2017

Изучение деления клеток

Митоз



Chromosomes- Membranese

Образец:

Митоз фибробластовых ретикулярных клеток мышей.

Протокол:

Клетки растили до 60% заселенности в DMEM среде в чашке Петри.

Эксперимент в течение длительного промежутка времени осуществлялся с применением инкубатора ibidi-nanolive top stage ncubator (темп 37°C и 5% CO2 в течение 8 часов), запись снимков каждые 30 сек.

Структурная информация, полученная в течение длительных временных интервалов:

- Мониторинг изменений клеточного коэффициента преломления, формы и размера во время клеточного цикла и митоза (например, конденсация ДНК, выравнивание хромосом и сегрегация)
- Измерение продолжительности клеточного цикла

3D структурная информация в боковой проекции:

- Мониторинг клеточной формы и толщины
- Обнаружение присоединения / отсоединения
- 3D форма и сегрегационный процесс хромосом

STEVE Определение индексов преломления:

Коэф-т преломления ДНК изменяется в ходе митоза. 3D Cell Explorer способен отличать различные стадии митоза, основываясь на изменении коэф-тов преломления хроматиновых групп.

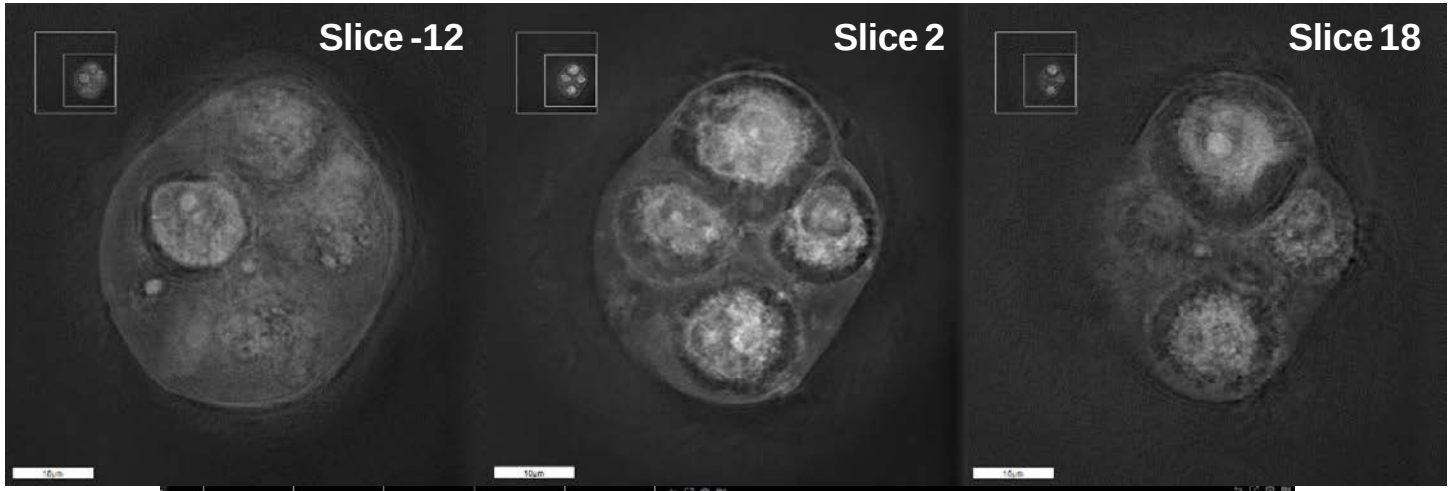
®Nanolive SA
2014-2017

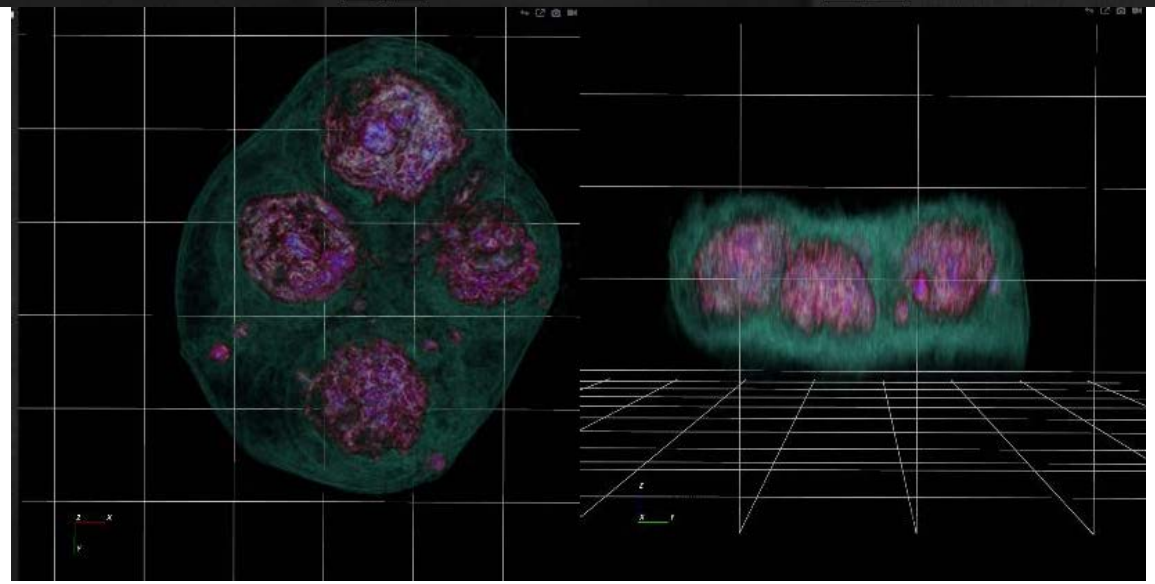
3D Cell Explorer

1. Введение
2. Примеры применений
   - Анализ деления клеток
   - 3D Клеточные культуры
   - Мониторинг межклеточного взаимодействия
   - Исследование гибели клеток
   - Цитология и гистология
3. Программное обеспечение и совмещение с инкубатором

Клеточные культуры

3D Клеточные культуры





Hydrogel matrix - HeLa cells

Образец:
HeLa клетки инкапсулированы в альгинатные шарики.

Протокол:
Альгинатные шарики образуются с использованием sciDROP PICO technology встроенной в sciFLEXARRAYER S3 (SCIENION AG, Germany).
Альгинатные шарики поместили на препаративное стекло с раствором DMEM и визуализировали через специальное покровное стекло.

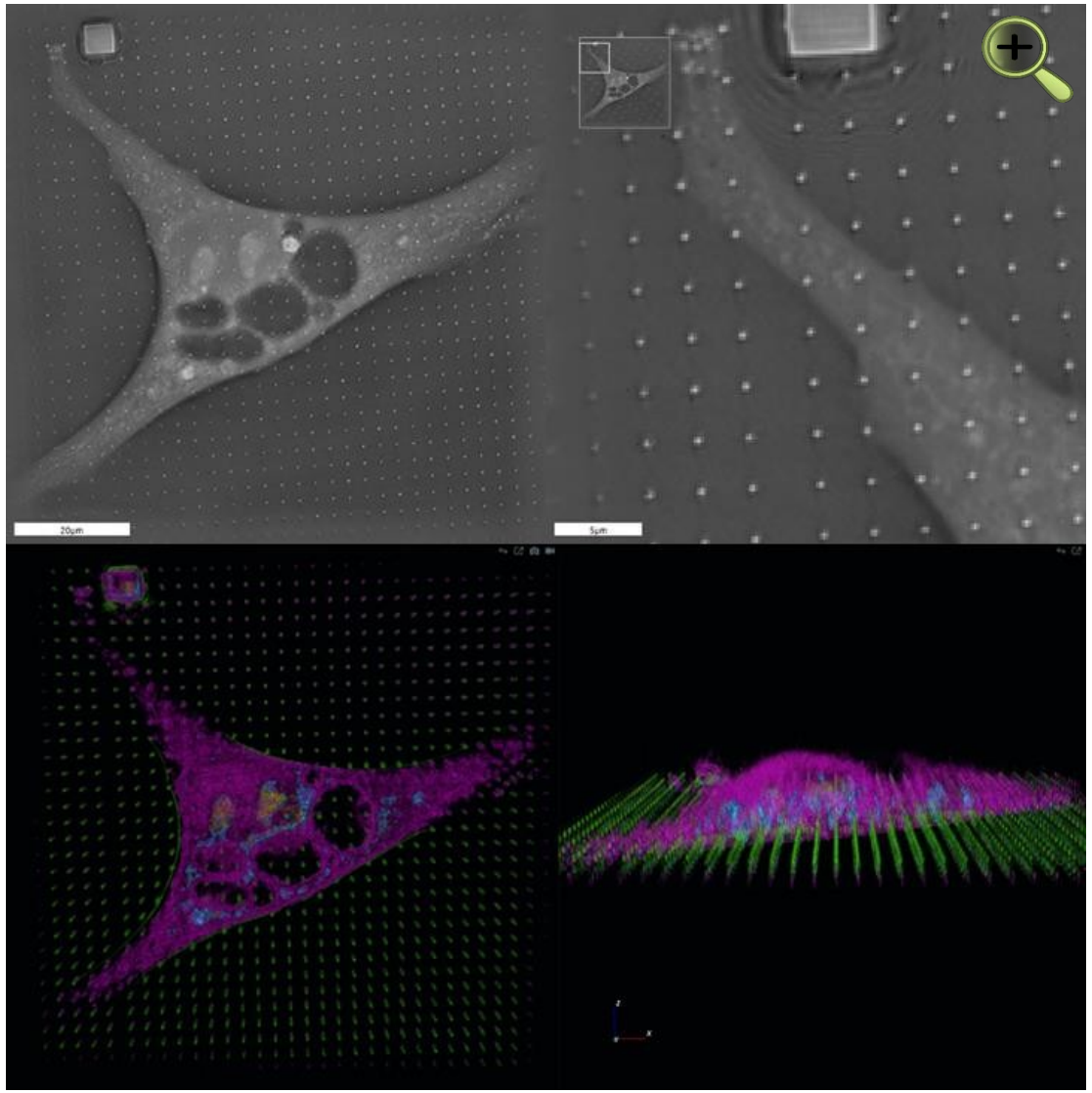
Томографическая структурная информация:
В этой подборке из 3 снимков отобранных для данного изучения можно с хорошей четкостью наблюдать клеточную организацию по вертикальной оси, формируя представление о комплексной структуре гидрогелевой матрицы и 3D распределении клеток.

STEVE Анализ коэффициентов преломления:
Функция измерения объема (основанная на цифровом окрашивании) позволяет определить объем матрицы и контролировать увеличение клеточного объема в режиме реального времени.

®Nanolive SA
2014-2017

Клеточные культуры

Клетки на микрокадре



Glass array - FRC

Образец:
Фибробластные ретикулярные клетки (FRC), высеянные на стеклянную нанополярную решетку.

Возможность масштабирования:

В увеличенном изображении мы можем наблюдать, как осуществляется адгезия клетки к подложке с помощью нанополярных структур.

STEVE Анализ коэффициентов преломления:

Стеклянная структура, как в случае наноосновы, имеет средний коэф-т преломления существенно отличающийся от диапазона коэф-тов преломления биологических образцов. Основываясь на этом, полученное цифровое пятно может использоваться для построения 3D изображений.

®Nanolive SA
2014-2017

3D Cell Explorer

1. Введение
2. Примеры применений
   - Анализ деления клеток
   - 3D Клеточные культуры
   - Мониторинг межклеточного взаимодействия
   - Исследование гибели клеток
   - Цитология и гистология
3. Программное обеспечение и совмещение с инкубатором

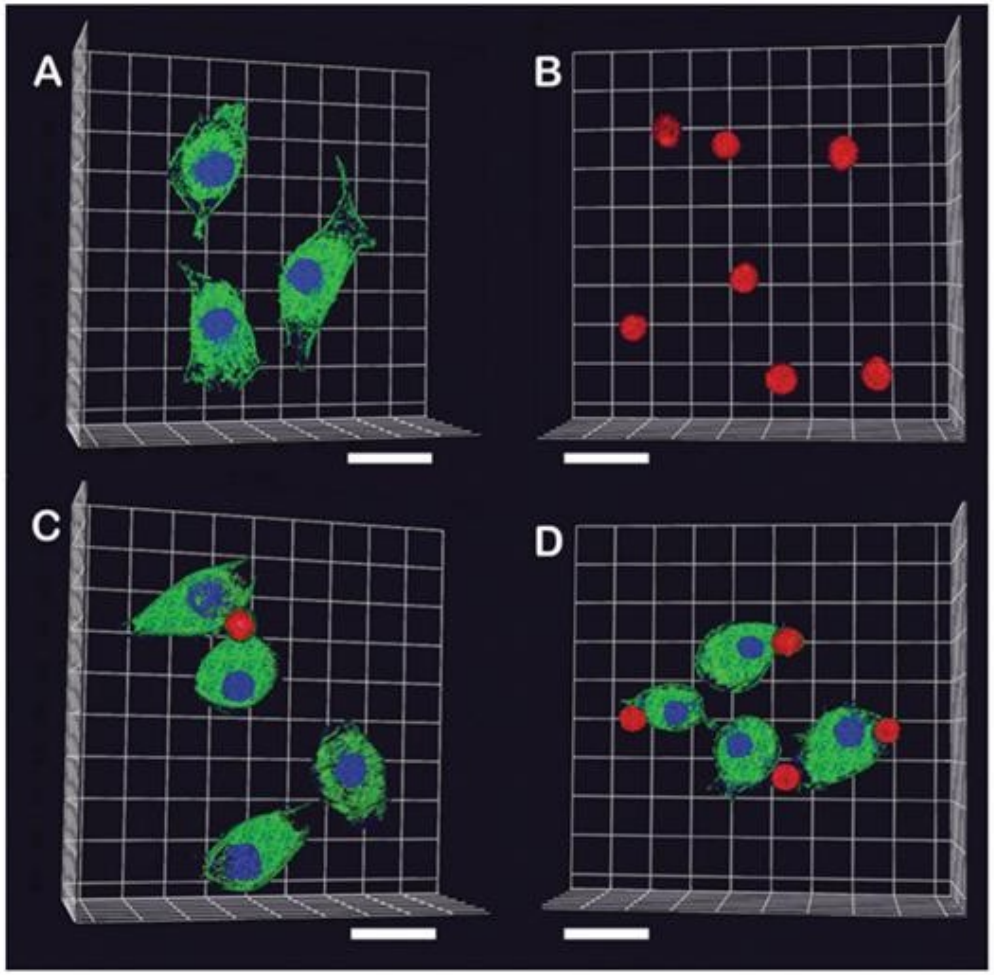
Межклеточное взаимодействие

RBCs и эндотелиальные клетки

From the journal:
Journal of Materials Chemistry B

Facile preparation of full-color emissive carbon dots and their applications in imaging of the adhesion of erythrocytes to endothelial cells

Zhiqiang Lai,[a] Xiaojuan Yang,[a] Aiqun Li,[a] Youyi Qiu,[a] Jiye Cai[a] and PeiHui Yang*[a]



В этой работе изучена сцепка между ретинобластными (RBCs) и эндотелиальными клетками с использованием многоцветных флюорицирующих углеродных точек (F-CDs) с целью изучения клеточных функций в новом свете и с расширенными возможностями CDs для “изучения клеточных функций, психологических и патологических состояний”.

Микроскоп 3D Cell Explorer использовался для изучения сцепки между ретинобластными (RBCs) и эндотелиальными клетками без использованием многоцветных флюорицирующих углеродных точек (F-CDs) с целью доказательства, что RBCs предпочитают поврежденные эндотелиальные клетки по сравнению с нормальными.

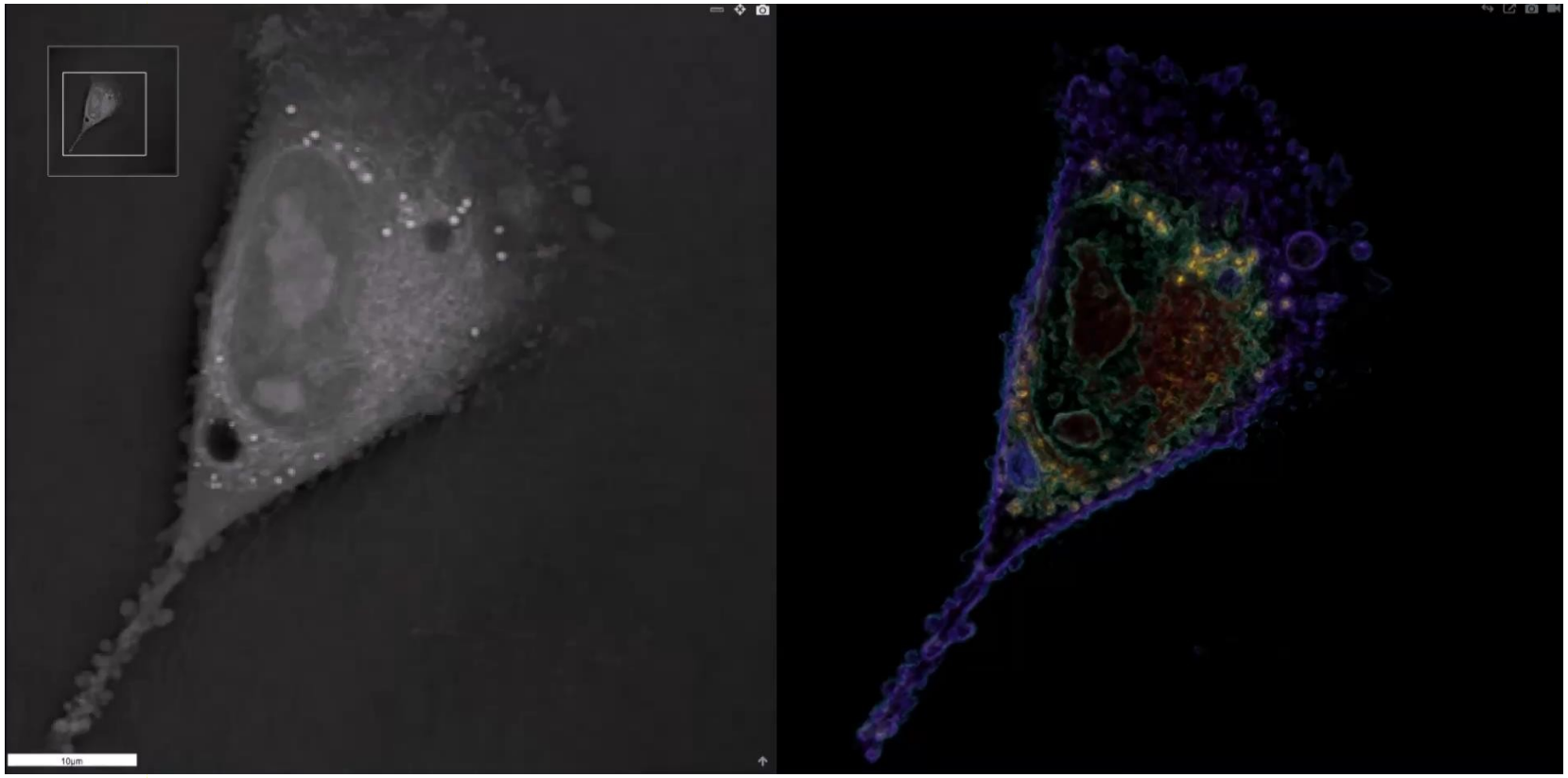
®Nanolive SA
2014-2017

3D Cell Explorer

1. Введение
2. Примеры применений
   - Анализ деления клеток
   - 3D Клеточные культуры
   - Мониторинг межклеточного взаимодействия
   - Исследование гибели клеток
   - Цитология и гистология
3. Программное обеспечение и совмещение с инкубатором

Гибель клеток

Апоптоз



Membrane – Nucleoli

Образец:
Апоптоз T685A человеческой клетки раковой меланомы.

Протокол:

Клетки растили до 60% заселенности в DMEM среде в чашке Петри.

Временная съемка эксперимента осуществлялась с применением инкубатора ibidi-nanolive top stage incubator (темп 37°C и 5% CO2 в течение 8 часов), запись снимков каждые 30 сек.

Структурная информация, полученная в течение длительных временных интервалов:

Мониторинг в реальном времени позволяет изучать типичные морфологические изменения в виде пузырей, сжатий клеток, конденсации хроматина.

STEVE Анализ коэффициентов преломления:

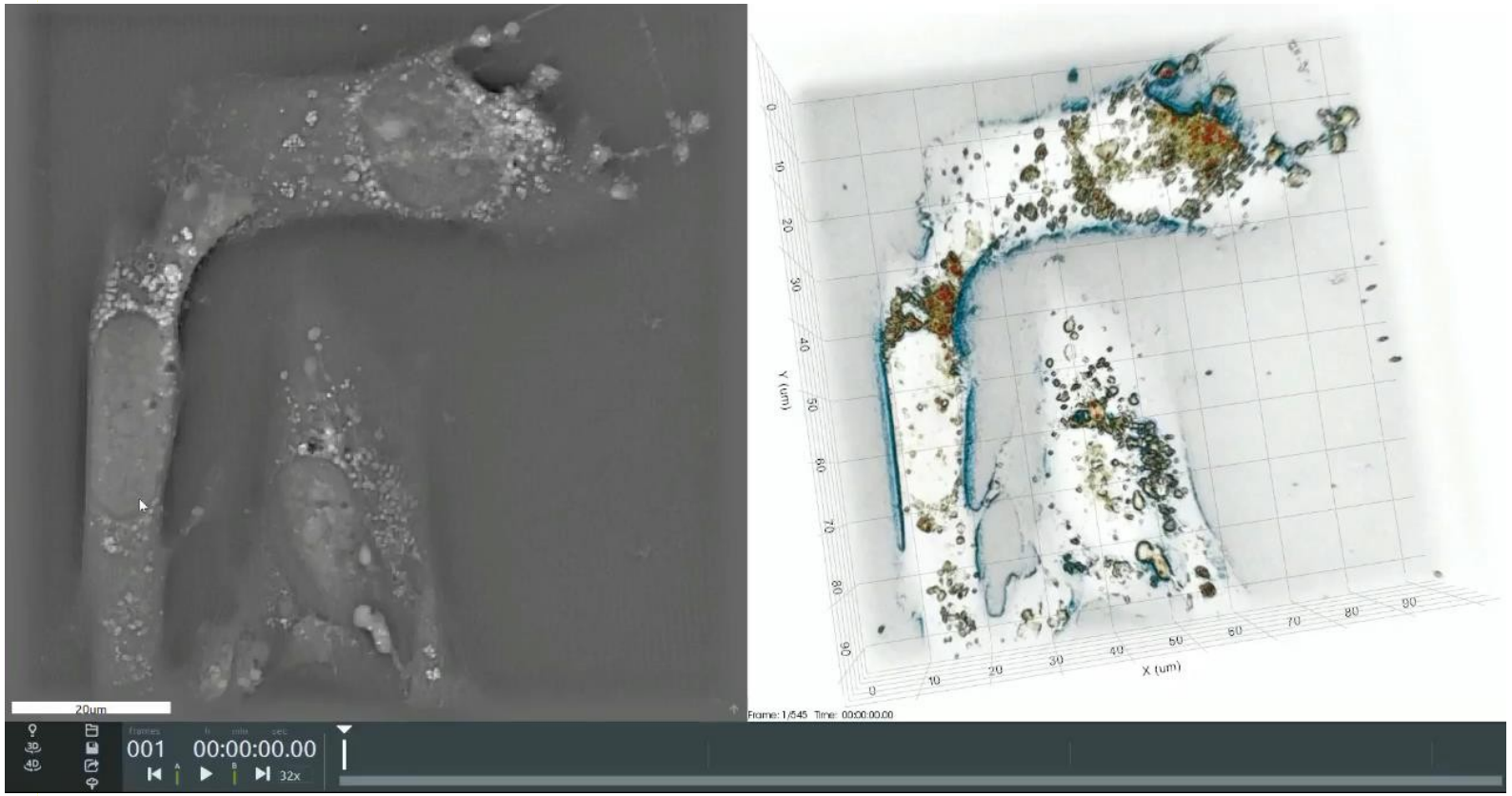
- Мониторинг коэф-тов преломления (увеличение клеточной плотности) при клеточном сжатии
- Изучение сокращения объема

®Nanolive SA
2014-2017

Незначительные изменения в ядре и хроматине

Гибель клеток

Самопожирание



Вакуоли – Автофагосомы – Зоны высокой плотности

Образец:
Аутофаговая гибель клеток, снятая в течение 8 часов после приема препарата.

Протокол:
Клетки глиомы мышей лечились антидепрессантом (imipramine) и разбавителем крови (ticlopidine), лекарственная смесь индуцирующей аутофагию. Временная съемка эксперимента осуществлялась с применением инкубатора ibidi-nanolive top stage incubator (темп 37°C и 5% CO2 в течение 24 часов), запись снимков каждую минуту.

Информация, полученная во времени:
Получение массива изображений в течение очень длительного времени (>24 часов) позволяет полностью изучить процесс аутофагии

- Незначительные изменения в ядре и хроматине
- Накопление аутофагосом и аутолизосом

STEVE Анализ коэф-тов преломления:

- Мониторинг индексов преломления и изучение уменьшения объема

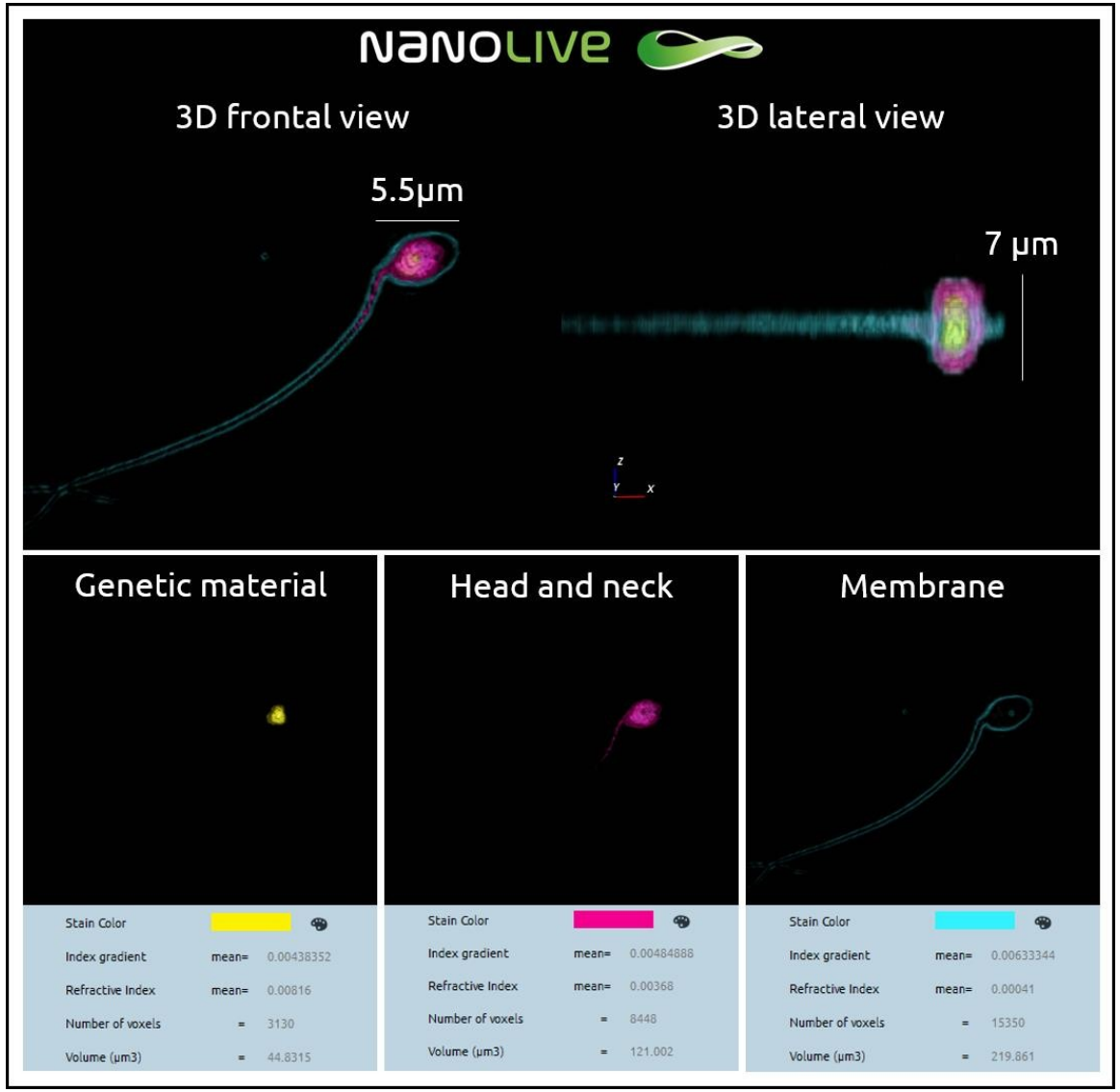
®Nanolive SA
2014-2017

3D Cell Explorer

1. Введение
2. Примеры применений
   - Анализ деления клеток
   - 3D Клеточные культуры
   - Мониторинг межклеточного взаимодействия
   - Исследование гибели клеток
   - Цитология и гистология
3. Программное обеспечение и совмещение с инкубатором

Цитология

Сперматозоид человека



Образец:
Клетки сперматозоиды

Протокол:
Клетки спермы фиксируются параформальдегидом (PFA) и помещаются на предметное стекло с натрий-фосфатным буфером (PBS).

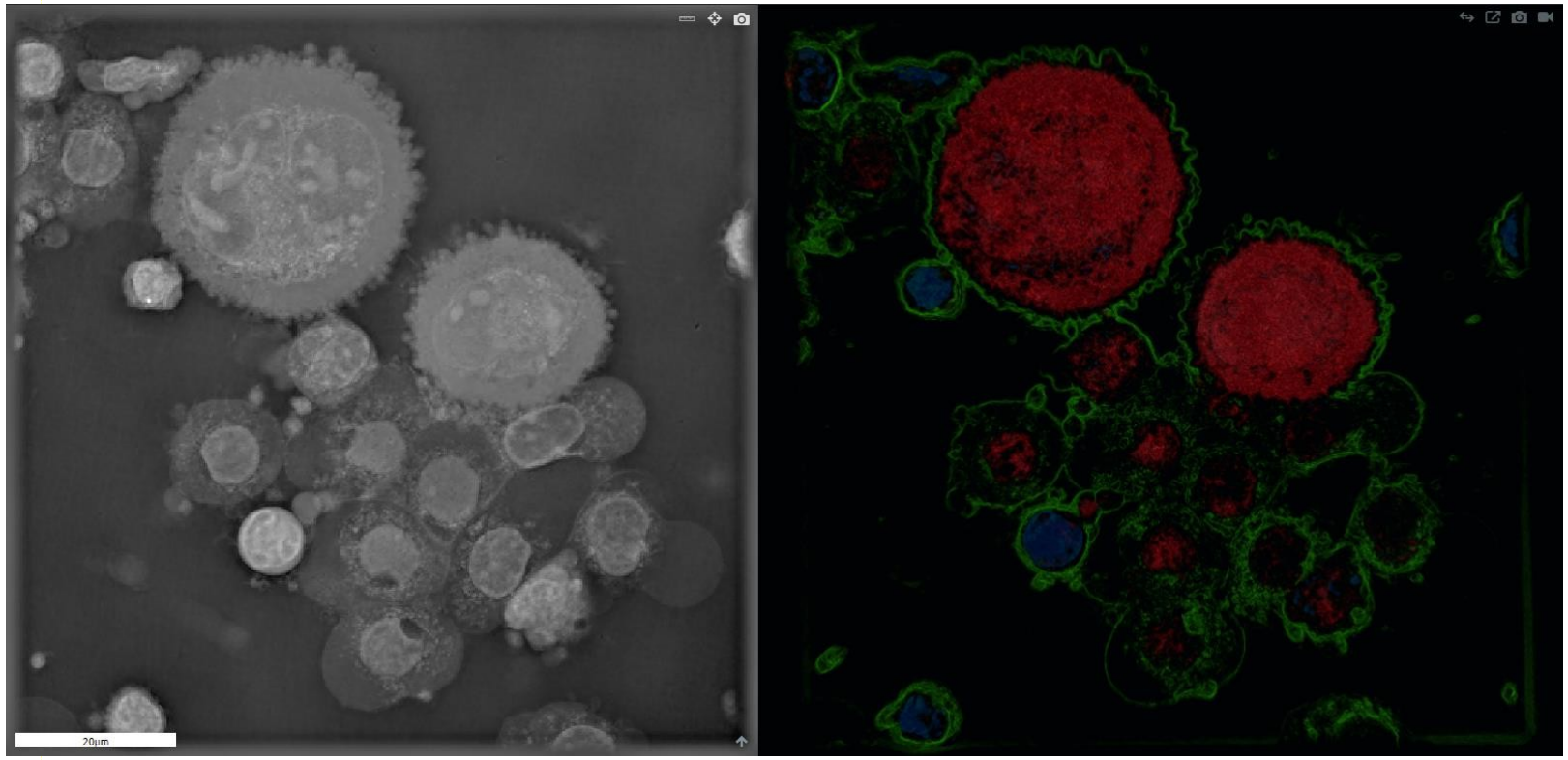
STEVE Анализ коэф-тов преломления:

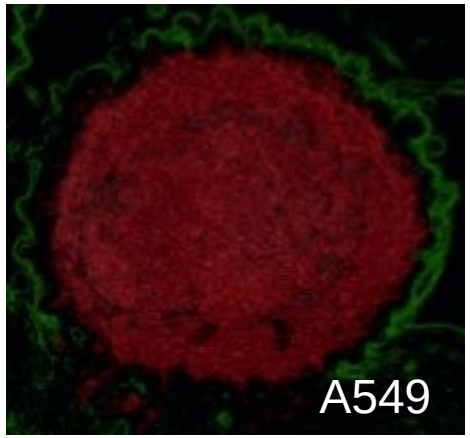
- Морфология
- Средняя величина коэф-та преломления
- Общий объем
- Боковая толщина
- Долгосрочный мониторинг жизнеспособности (после 12 или 24ч)

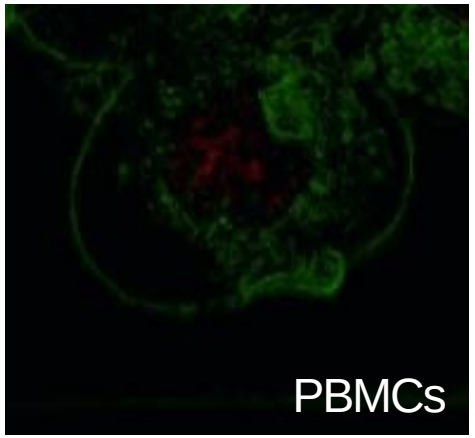
®Nanolive SA
2014-2017

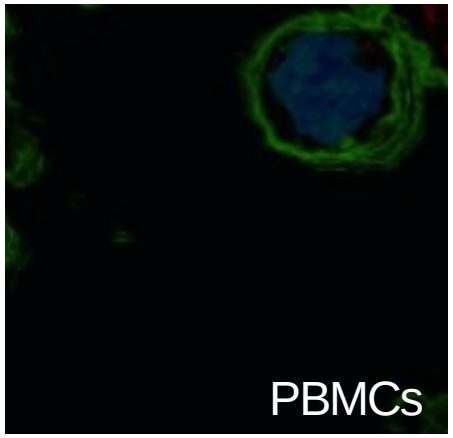
Цитология

Жидкая биопсия: Циркулирующие опухолевые клетки (CTCs)









Образец:

A549 и Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMCs)

Протокол:

В цельную кровь ввели клетки рака легких A549 и поместили в специальное устройство Parsortix instrument с целью увеличения количества CTCs (ЦОКс). После обработки образца в Parsortix instrument (A549 и Мононуклеарные клетки периферической крови PBMCs) были снова суспендированы в NaP-буфер и рассмотрены на 3D Cell Explorer.

STEVE Анализ коэф-тов преломления:

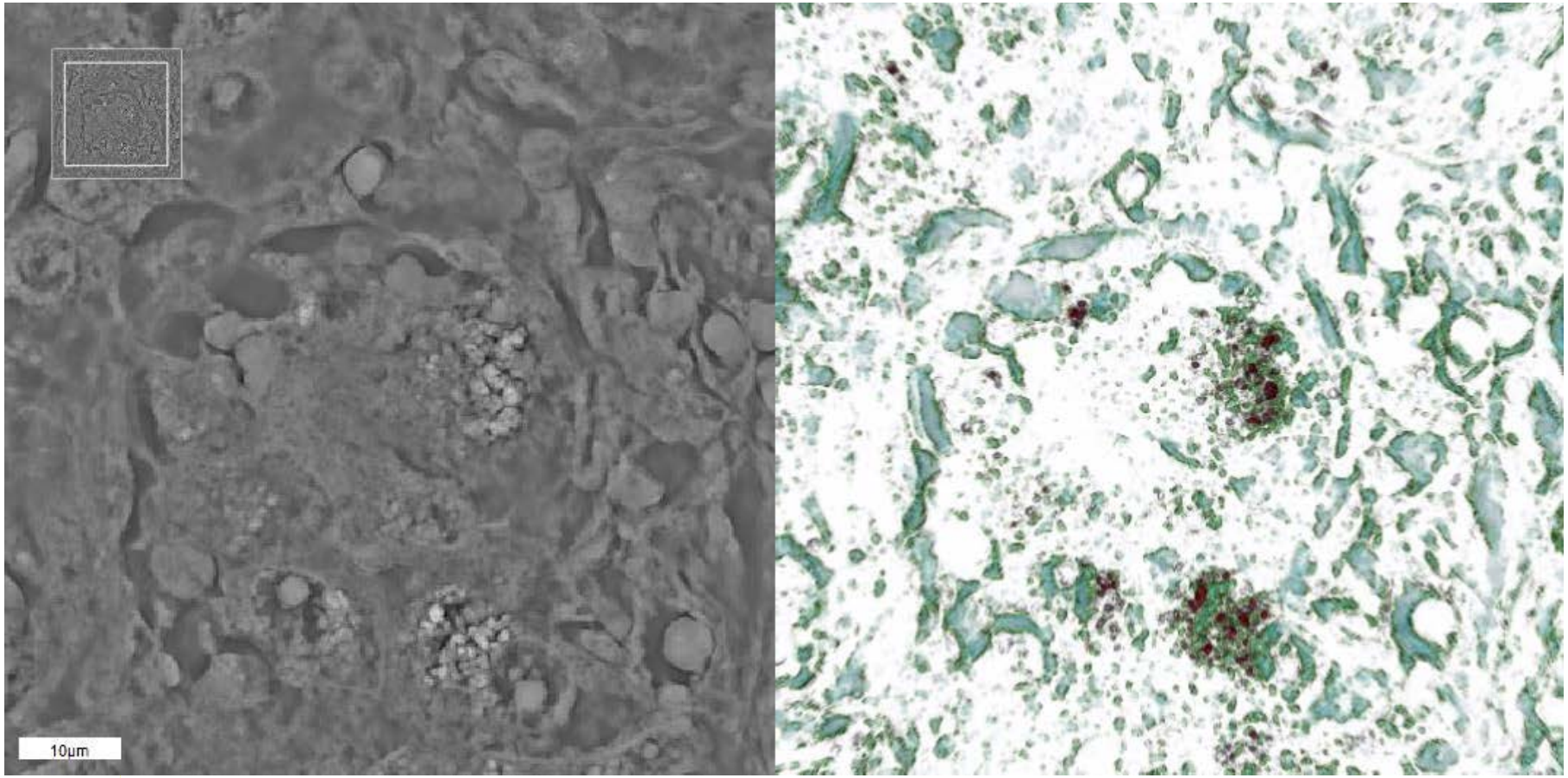
A549 (Красный) характеризуются большой шарообразной формой (диаметр > 20 микрон) они как правило многоядерны (2-3 ядра).

PBMCs могут быть двух видов: круглой и плоской формы которые оседают на дно посуды (примерно 15 микрон в диаметре) или плавающие сферические клетки (менее 10 микрон в диаметре), характеризующиеся высоким и однородным коэф-том преломления в области ядра (Синий). Они обладают одним, четко определенным ядром.

®Nanolive SA
2014-2017

Гистология

Печень с наночастицами



Nanoparticles

Образец:
Фрагмент ткани печени с наночастицами

Потокол:
Регидратированная ткань печени (фрагмент 5 мкм толщиной) был помещен на предметное стекло со специальным реактивом Fluoromount Gmounting medium.

STEVE Анализ коэф-тов преломления:
- Локализация наночастиц, основанная на их высоких коэф-тах преломления
- Определение объемных размеров кластеров наномолекул

®Nanolive SA
2014-2017

Программное обеспечение и инкубатор на предметном столе UNO-T-H-CO2

https://www.youtube.com/watch?v=c53B9xLcr0c

Верхняя камера

Совместимые расходные материалы O_2 и CO_2 помпа

Контроллер

Колонка влажности

®Nanolive SA
2014-2017

Nanolive

Пользователи

Awards

Partners

®Nanolive SA
2014-2017