



PLATAFORMA PROTEÒMICA

PE/IdISBa/PT-PROT-1.008_NS3-v01

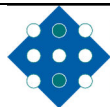
PROCEDIMIENTO DE NanoSight
NS300

Revisión nº: **1**

Fecha de emisión:

Copia nº:

Realizado:	Revisado:	Aprobado:
Fdo. Carlos Río	Fdo.	Fdo.
Fecha:	Fecha:	Fecha:



ÍNDICE

1. OBJETIVO

2. ALCANCE

3. DEFINICIONES

4. PROCEDIMIENTO

4.1. *Descripción equipo*

4.2. *Componentes del sistema*

4.3. *Cómo funciona*

4.4 *Protocolo*

4.4.1 *Software NanoSight NTA*

4.5 *Mantenimiento y Limpieza del equipo*

5 REFERENCIAS

6 ANEXOS

1. OBJETIVO

El objetivo de este documento es definir el procedimiento de utilización del NanoSight NS300 para todos los usuarios del equipamiento de proteómica autorizados de la Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa).

2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación para todo el personal de laboratorio experto en el manejo de este aparato y que hay recibido formación específica por parte de los distribuidores del equipo o del técnico de soporte de la plataforma.

3. DEFINICIONES

Movimiento browniano: es el movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido, como resultado de choques contra las moléculas de dicho fluido.

NTA: Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis). Es una técnica de caracterización de partículas a escala nanométrica mediante la captura de la luz dispersa que experimentan estas por el movimiento browniano. El NTA proporciona datos de tamaño de partícula de alta resolución, partícula por partícula, junto con mediciones de concentración para suspensiones coloidales o soluciones de nanopartículas, todo en cuestión de minutos y con una preparación mínima de la muestra.

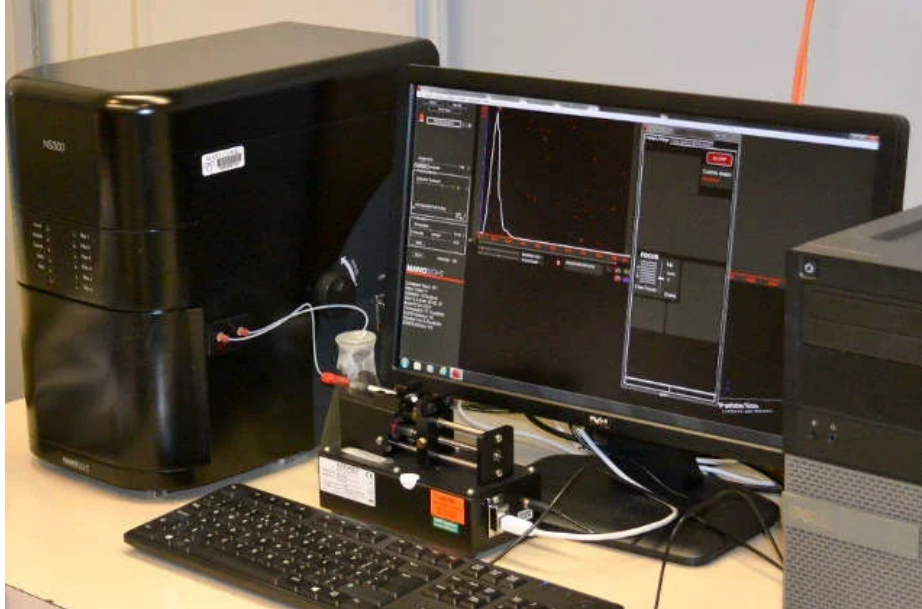
4. PROCEDIMIENTO

4.1. Descripción equipo

El NS300 permite un análisis rápido y automático de la distribución de tamaños y la concentración de todo tipo de nanopartículas, desde 10 a 1000 nm de diámetro, dependiendo de la configuración del instrumento y el tipo de la muestra. Un rayo láser pasa a través de la cámara de la muestra, y las partículas en suspensión en el camino de este haz dispersan la luz de tal manera que pueden verse fácilmente a través de un microscopio de 20 aumentos en el que está montada una cámara. La cámara funciona a 30 cuadros por segundo (cps) y captura un video de las partículas en su movimiento Browniano natural. El software rastrea las partículas individualmente y por medio de la ecuación de Stokes-Einstein calcula el diámetro hidrodinámico de cada una de ellas.



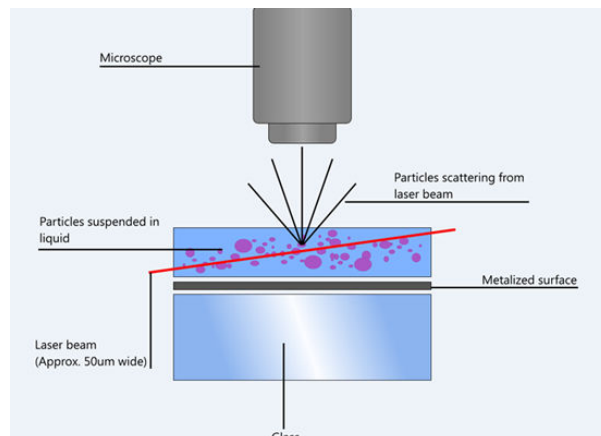
Imagen del sistema:



4.2. Componentes del sistema

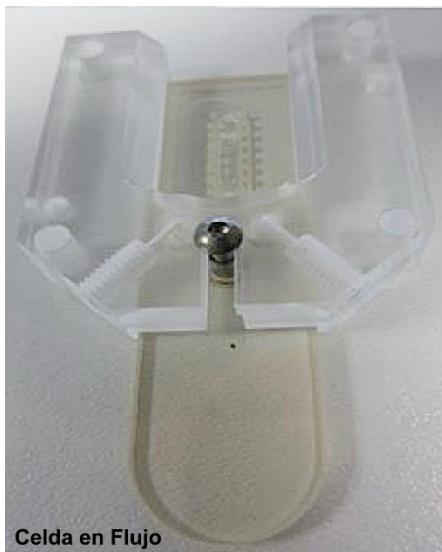
Los equipos **NanoSight** se componen de:

- Elemento óptico de cristal (prisma)
- Láser que ilumina las partículas
- Celda de muestra
- Micro-cámara



El elemento de cristal o **prisma** es el encargado de dirigir el láser en la dirección correcta hacia la muestra, iluminando las partículas a analizar.

El **láser** va integrado en un módulo junto con el resto de partes ópticas (a excepción de la cámara) y un peltier para su termostatación.



Celda en Flujo

- Sólo con bomba de jeringa*
- Sólo acuosos
- Ideal para fluorescencia y medidas de concentración



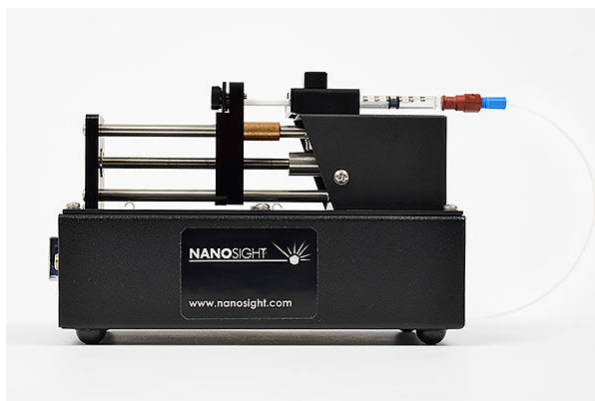
Celda en Batch

- Muestras más viscosas
- Partículas grandes
- Solventes

El NS300 lleva una **micro-cámara** de tipo Hama/OEM sCMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor).

*Bomba de jeringa

- Se recomienda para medidas de fluorescencia y muestras poco concentradas
- La velocidad de la bomba es controlada por el software
- Unidades de Flujo Arbitrarias
- Se necesita 1 ml



Además, el control de temperatura se realiza con un Peltier.

- Puede controlar la temperatura entre 5 °C bajo la temperatura ambiente y 50 °C
- Mantener temperaturas altas durante más de 15 minutos no es una buena praxis.
- El láser se puede dañar por sobrecalentamiento.

4.3. *Cómo funciona*

Las partículas son iluminadas por un láser de diodo, emitido en una dirección cercana a la perpendicularidad con el microscopio, evitándose así que el brillo directo del láser entre en el detector.

Las partículas iluminadas emiten luz dispersada en todas las direcciones. Esta luz dispersada es captada por la micro-cámara y analizada por el software.

Lo que vemos **NO** son las partículas. Éstas son muy pequeñas como para visualizarlas con un microscopio óptico. En realidad, observamos la luz dispersada por estas partículas. Visualizamos las partículas en movimiento Browniano. La velocidad con la que se mueven es directamente proporcional a su tamaño.

El NanoSight no requiere calibración para la determinación de tamaño de partícula, pero sí para el cálculo de concentración. El principio de dimensionamiento de NTA es absoluto, por lo que no se requiere calibración. Cada partícula se dimensiona de forma independiente y se mide simultáneamente, lo que permite una comprensión profunda incluso de muestras muy complejas. El cambio más pequeño en el tamaño de las partículas se detecta con precisión, para brindar información rápida sobre eventos como la agregación dentro de la población. Esta precisión y sensibilidad es invaluable cuando

se considera la pureza del lote de nanopartículas y la consistencia del proceso, así como las propiedades fisicoquímicas del material, que están intrínsecamente vinculadas a su tamaño a nanoescala.

4.4. Protocolo

Inyectando la muestra en función del tipo de celda:

Llene una jeringa con la muestra adecuada. Las placas superiores están diseñadas para usarse con una jeringa de 1 ml. Las jeringas de gran calibre (> 2,5 ml) pueden producir inadvertidamente altas presiones que pueden dañar la placa superior y no deben utilizarse.

Retire las burbujas de aire de la jeringa.

Al cargar la cubeta de muestra en seco, el líquido debe introducirse lo más lentamente posible. Esto evita generar presiones que podrían resultar en que la muestra pase por alto los sellos en la cámara de muestra o dañe la placa superior. La carga lenta de la muestra también limita la introducción de burbujas.

Para Celda en Batch:

Sostenga el módulo láser verticalmente, de modo que el puerto de entrada frontal esté a un nivel más bajo que el puerto de salida posterior. Luego, la cámara se puede llenar lentamente contra la gravedad, permitiendo que se escapen las burbujas.

Inserte la jeringa en el puerto de entrada frontal e introduzca la muestra lentamente en la cámara. La placa superior no debe cargarse a velocidades superiores a 1 ml en 10 segundos.

La placa superior de la junta tórica siempre debe secarse entre cada muestra o carga de tampón, y no es adecuada para el cambio de líquido sin desmontaje.



Celda en Batch (O-ring top-plate)

Requiere desmontaje y limpieza manual después de cada muestra, pero proporciona una mayor compatibilidad química para disolventes no acuosos o muestras que son más viscosas o contienen partículas más grandes, que pueden bloquear la celda en flujo.

Para Celda en Flujo (Flow-cell top plate):

Coloque la jeringa en el puerto luer en el extremo del tubo de entrada, asegurando el contacto de líquido a líquido si el sistema ya se ha cargado con solución tampón.

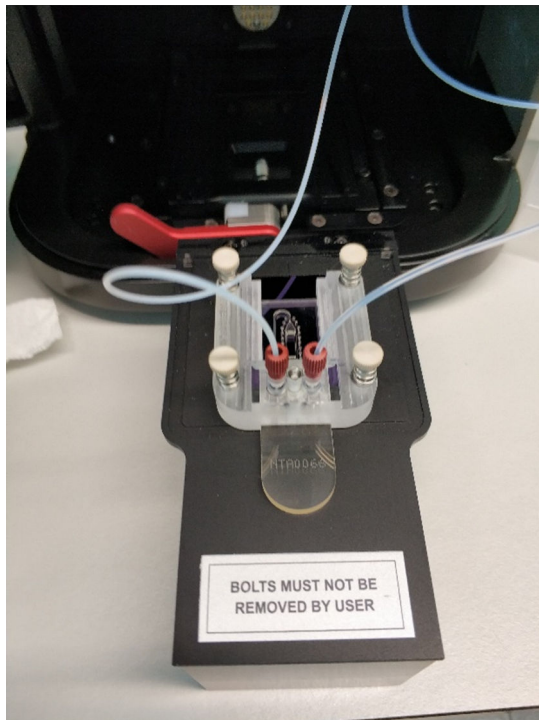
Introduzca la muestra lentamente en la cámara. La placa superior no debe cargarse a velocidades superiores a 1 ml en 10 segundos.

Al cargar la cámara desde seco, el líquido debe introducirse lo más lentamente posible. Esto evita generar presiones que podrían resultar en que la muestra pase por alto los sellos en la cámara de muestra o dañe la placa superior. La carga lenta de la muestra también limita la introducción de burbujas.

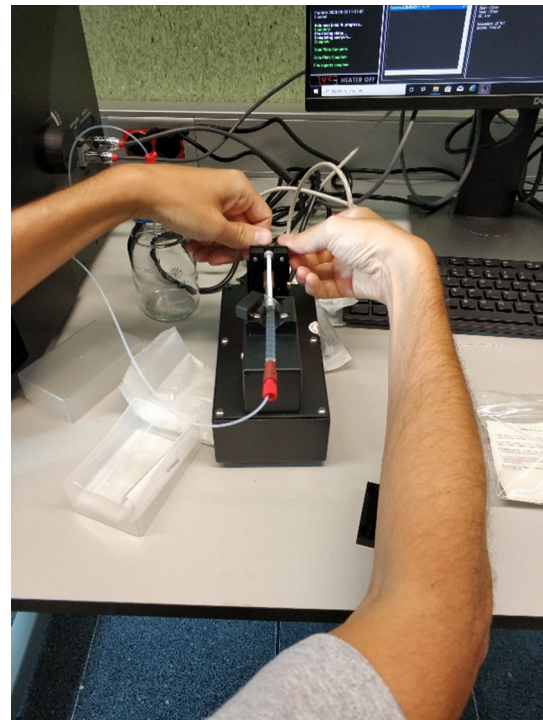


Celda en Flujo (Flow-cell top plate)

Se puede limpiar haciendo pasar líquido de lavado a través de la cámara, evitando la necesidad de desmontar y limpiar manualmente la cámara después de cada muestra.



El tubo del puerto izquierdo de la placa superior debe conectarse al puerto de entrada izquierdo de la carcasa del NS300.

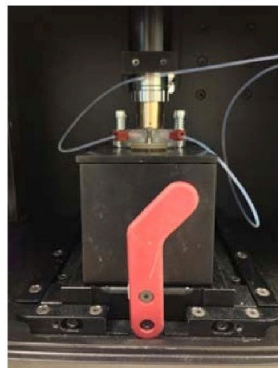


Una vez que vea que sale líquido en el tubo de desechos, coloque la jeringa en el soporte de la **bomba de jeringa**.

El tubo del puerto de la derecha de la placa superior debe conectarse al puerto de desechos derecho de la carcasa del NS300.



Montaje / desmontaje del módulo láser



Módulo láser en posición de bloqueo

Una vez que la muestra se carga sin bolsas de aire o burbujas, el módulo láser debe montarse dentro de la carcasa del instrumento principal. Gire la palanca roja dentro del NS300 hacia la izquierda para permitir que se monte el módulo láser. Coloque el módulo láser en la diapositiva y empújelo suavemente hacia adelante hasta que encaje con el conector de alimentación del interior. La palanca roja en el interior debe girarse hasta que quede vertical para bloquear el módulo láser en su lugar, asegurando un posicionamiento reproducible. A continuación, se debe cerrar la puerta de acceso.

4.4.1 Software NanoSight NTA

Ejecute el software NTA (última versión: **NanoSight NTA 3.4.4**). Haga clic en **Capture** (Capturar) en la esquina superior izquierda de la pantalla para ingresar al modo de captura, la cámara tardará unos segundos en inicializarse.

Ajuste el nivel de la cámara para que todas las partículas sean visibles. Cuando la imagen comienza a mostrar píxeles de colores, la luz de la imagen está saturando la cámara y el nivel de la cámara debe reducirse. El color de los píxeles saturados reflejará el color del láser en uso.

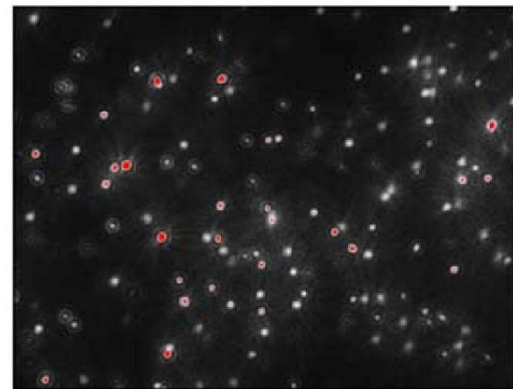
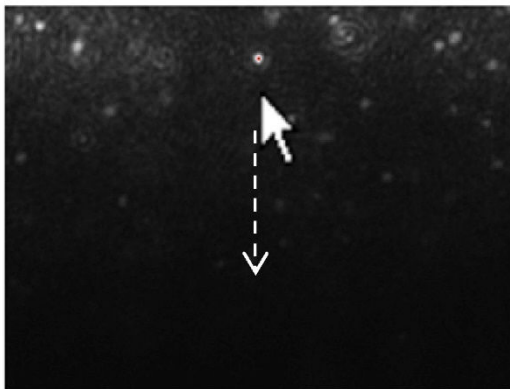
Malvern configura y calibra la posición de imagen del NS300. El sistema está diseñado para tener una buena reubicación del haz una vez configurado, aunque pueden ser necesarios pequeños ajustes para optimizar la imagen. Si el rayo parece no estar en el



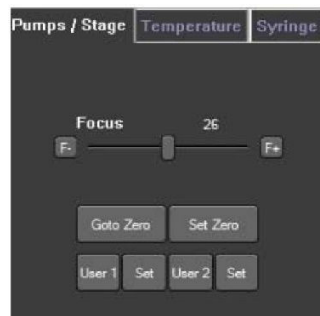
centro del campo de visión de la pantalla, es decir, no ocupa la parte superior o inferior de la pantalla, la imagen se puede ajustar hacia arriba y hacia abajo en una pequeña cantidad.



1. Con una vista de las partículas en la pantalla NTA en modo de captura, haga clic con el botón izquierdo del mouse en la imagen de video.
2. Mantenga presionado el botón izquierdo del mouse y arrastre la imagen hacia arriba o hacia abajo hasta que el rayo láser ilumine partículas en todo el campo de visión.



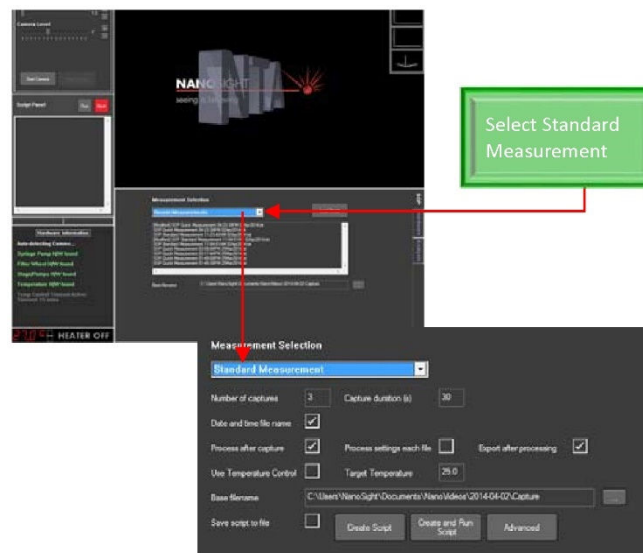
El enfoque siempre debe optimizarse para dar una imagen clara y nítida de las partículas. El enfoque se puede ajustar usando el control deslizante en el software NTA



... o manualmente usando el dial de enfoque en el lado derecho de la carcasa del instrumento. Para ajustar el enfoque en el software, use la barra deslizante de enfoque en el Panel de control de hardware. El enfoque también se puede ajustar con la rueda del mouse.

Arrastrar el control deslizante de la izquierda proporciona ajustes precisos, mientras que el control deslizante de la derecha proporciona ajustes más rápidos.

Capturar videos: Una vez que se pueda ver una imagen en la pantalla de captura, ajuste el enfoque según corresponda. Se puede grabar una película con los ajustes adecuados de la cámara. Seleccione Medición estándar, ajuste el número y la duración de la captura según sea necesario. Inicie la captura con "Crear y ejecutar script". La grabación se puede cancelar en cualquier momento utilizando el botón rojo "Abortar".



Mientras se esté ejecutando el programa de comunicaciones de temperatura, la temperatura de la muestra se mostrará en la pantalla de captura de NTA y se guardará automáticamente con el video.

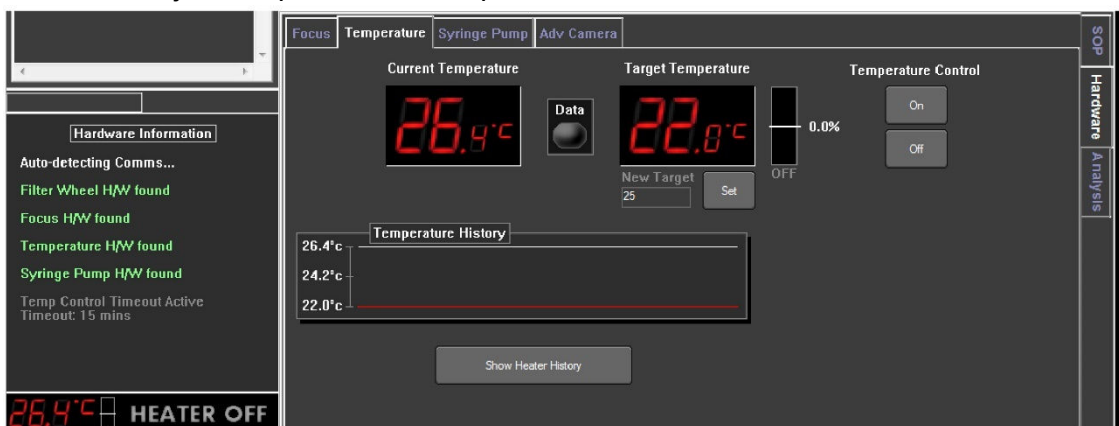
Control de temperatura: Los elementos Peltier dentro del módulo láser funcionan como una bomba de calor que transfiere calor de un lado del Peltier al otro (es decir, empujan el calor de una cara a la otra haciendo que un lado esté caliente y el otro frío). Se alimentan eléctricamente y la potencia se puede controlar variando con precisión el

voltaje (y por lo tanto la corriente) a través de los elementos Peltier. Hay un termistor para medir la temperatura colocado dentro del cuerpo del módulo láser. La medición de temperatura se retroalimenta a la tarjeta del controlador y la potencia se ajusta para alcanzar la temperatura deseada.

1. El controlador de temperatura debe apagarse si se deja desatendido.
2. Se debe controlar el cuerpo principal de la unidad de visualización para asegurarse de que no se sobrecaliente. Esto es posible si el control de temperatura se establece en una temperatura alta (> 40°C) o una temperatura baja (<ambiente) durante un largo período de tiempo.
3. Es importante que la calefacción no se salga de control. Esto puede suceder si se establece una temperatura alta o baja durante mucho tiempo. En cualquier caso, el módulo láser se calentará significativamente. Si esto sucediera, debe apagar el controlador de temperatura del NTA. Alternativamente, en un caso extremo, se puede quitar el conector de alimentación de la caja de control. Nota: si esto ocurre, puede que no sea suficiente ajustar la temperatura más baja, el controlador de temperatura debe apagarse.
4. Al enfriar la muestra por debajo de la temperatura ambiente, el control de temperatura solo debe utilizarse durante un máximo de 15 minutos cada vez, antes de apagarlo durante al menos 15 minutos. El enfriamiento prolongado puede provocar una acumulación excesiva de calor alrededor del módulo láser, lo que puede provocar fluctuaciones en la potencia del láser y posibles daños a largo plazo.

Inicialización:

1. Encienda el NS300
2. Encienda la PC.
3. Cargue el software NanoSight NTA
4. La caja del sensor de temperatura se puede encontrar en la pestaña Hardware inferior, debajo de la pestaña de temperatura.



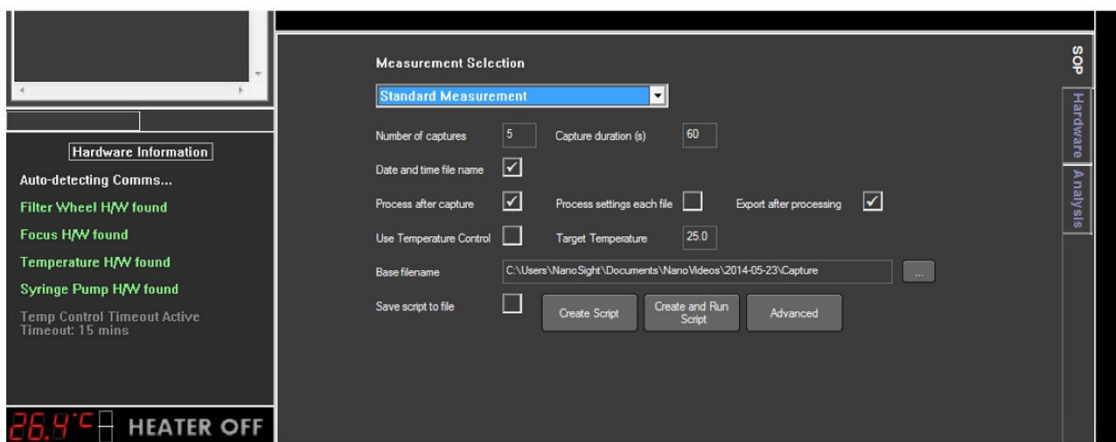
Ajuste de temperatura:

Manualmente:

1. El control de temperatura se puede encender y apagar.
2. La "set temperature" (temperatura establecida) predeterminada es 25°C. Para cambiar esta temperatura, haga clic en el cuadro "New target" (Nuevo objetivo) y escriba la temperatura requerida, p. ej. haga clic en el pequeño 25.0 en la imagen de arriba. Escriba la temperatura que necesita y haga clic en "Set" (Establecer).
3. El controlador de temperatura ahora funcionará para ajustar la temperatura de la placa superior a la temperatura objetivo. Se debe esperar algún rebasamiento. Dependiendo de la precisión de la temperatura requerida, se deben dejar hasta 30 minutos para que la temperatura de la muestra se estabilice por completo. La línea en ángulo muestra un rastro de la temperatura durante los últimos 200 segundos. Esta línea tiene escala automática, pero no tiene etiquetas.
4. Se puede programar una nueva temperatura para cambiar la temperatura (repetiendo los pasos 2 y 3).
5. Cuando termine con el sistema, presione el botón "off" (apagado) en NTA para apagar el controlador de temperatura. La lectura de temperatura continuará.
6. Cuando se inicialice el sensor de temperatura, haga clic en el botón On/Off (Encendido / Apagado).
7. La "set temperature" (temperatura establecida) predeterminada es 25°C. Para cambiar esta temperatura, haga clic en el cuadro a la derecha del sensor de temperatura y escriba la temperatura requerida, p. ej. haga clic en el pequeño 23.0 en la imagen de arriba. Escriba la temperatura que necesita y haga clic en "OK" (Aceptar).
8. Haga clic en el botón "Set" (Establecer) debajo de éste.
9. El controlador de temperatura ahora funcionará para ajustar la temperatura de la placa superior a la temperatura objetivo. Se debe esperar algún rebasamiento. Dependiendo de la precisión de la temperatura requerida, se deben dejar hasta 30 minutos para que la temperatura de la muestra se estabilice por completo. La línea en ángulo muestra un rastro de la temperatura durante los últimos 200 segundos. Esta línea tiene escala automática, pero no tiene etiquetas.
10. Se puede programar una nueva temperatura para cambiar la temperatura (repetiendo los pasos 2 y 3).
11. Cuando termine con el sistema, presione el botón "off" (apagado) en NTA para apagar el controlador de temperatura. La lectura de temperatura continuará.

A través de la medición:

1. Al planificar una medición, la temperatura a la que se debe tomar la medición se puede configurar haciendo clic en el cuadro "Target temperature" (Temperatura objetivo) debajo de la pestaña SOP.
2. Escriba la temperatura requerida.
3. Marque el botón "Use Temperature Control" (Usar Control de Temperatura).



4.5. Limpieza del equipo

Limpie suavemente la ventana de vidrio de la placa superior con un paño suave y seco (por ejemplo, Mediwipes) para eliminar las rayas de la superficie, luego seque con aire comprimido (si es posible).

Limpieza del exterior del equipo y superficies expuestas como el soporte de la placa con un trapo húmedo (agua). Vigilar periódicamente que los filtros y espejos estén limpios.

Celda en Batch (O-ring top-plate):

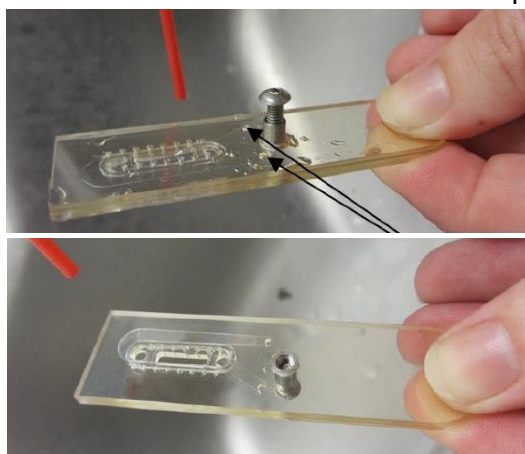
Requiere desmontaje y limpieza manual después de cada muestra.

Celda en Flujo (Flow-cell top plate):



Aplicar baja presión con agua o 10% etanol en agua si es posible.

Con aire seco a presión (si es posible):



Seque bien el canal a través de los orificios en la parte superior del componente de la junta.

Seque la parte inferior del componente de la junta, manteniendo la boquilla del limpiador de aire alejada del sello.

5. REFERENCIAS

NanoSight NS300 user guide

https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/NanoSight_NS300%20-%20user%20guide.pdf

NanoSight NS300 - Malvern Panalytical

<https://bit.ly/3oiR6gc>

Nanosight - iesmat

https://iesmat.com/catalogos/WC_MALNANO/nanosight/

Catálogo de productos IESMAT

<https://iesmat.com/action/download/?h=508b1d751ce52ab4a21cb20b745dc408&f=NanoSight%20range.pdf>

6. ANEXOS

Vídeos sobre funcionamiento general del equipo:

NanoSight NS300 - Primera puesta en marcha (IESMAT)

<https://youtu.be/AKWepNGu3n4>

NTA Video Quick Start Guide for NS300

<https://youtu.be/uscqJj5cmAQ>

Loading the LM14 Laser Module Product Training Video

<https://youtu.be/4KCQ6X641oM>

NTA Video Guide - Syringe Pump Use and Fluorescence Measurements

<https://youtu.be/R4DnpgpJUbw>

