Ручной автоматический счетчик клеток Scepter 3.0

Обеспечивает быстрый подсчет клеток размером 8,0–25,0 мкм и частиц размером 6-36 мкм (с датчиком 60 микромоль) или клеток размером 4,0-25 мкм и частиц размером 4-18 мкм (с датчиком 40 микромоль).

Счетчик клеток Scepter™ 3.0 сочетает в себе простоту автоматизированного измерения с точностью принципа Coulter для обнаружения частиц на основе импеданса и удобный портативный формат.

Счетчик клеток Scepter™ 3.0 при использовании в сочетании с датчиком с апертурой 40 или 60 мкмоль может точно подсчитывать и точно определять размеры широкого спектра типов клеток и частиц.

Дизайн счетчика клеток Scepter™ 3.0 отличается улучшенной эргономикой для упрощения работы одной рукой, увеличенным экраном и интуитивно понятным пользовательским интерфейсом. Увеличенный дисплей упрощает выполнение подсказок и просмотр результатов.

Обтекаемая форма аспирационного наконечника упрощает отбор клеток непосредственно из микроцентрифужных пробирок и лунок планшета. Объем аспирации – 50 мкл.

Scepter 3.0 позволяет произвести подсчет клеток и выполнить связанные вычисления в 7-10 раз быстрее, чем традиционная гемоцитометрия или другие автоматические счетчики. Более того, применение автоматического устройства для подсчета и статистических вычислений позволяет избежать многочисленных потенциальных ошибок, связанных с человеческим фактором, таких как: неточное приготовление раствора красителя, некорректное заполнение камеры для подсчета клеток, невнимательность при подсчете, ошибки при вычислении результатов и их документировании.

В приборе используется комбинация аналогового и цифрового оборудования для измерения, обработки сигналов, хранения данных и графического отображения.

Одноразовый микрофлюидный датчик имеет апертуру в зоне обнаружения клеток, что позволяет прибору использовать принцип Коултера для различения размера и объема частиц с субмикронным и субпиколитровым разрешением соответственно. Датчик легко крепится к прибору Scepter™ 3.0 и отсоединяется нажатием кнопки.

Зарядная станция, крепится на вытяжном боксе для тканевых культур или в любом другом месте, где она может быть под рукой.

Устройство также совместимо с WiFi® для беспроводной передачи данных.

В автоматическом счетчике клеток Scepter 3.0 используется принцип Коултера, обеспечивающий быстрый подсчет объектов менее чем за 40 секунд. Образец клеточной культуры предварительно разбавляется. После аспирации прибором образца на экране прибора отображаются данные о концентрации клеток, их среднем диаметре, среднем объеме и гистограмма размера или распределения объема.

Гистограмму можно дополнительно проанализировать с помощью встроенного обозревателя гистограмм. Для каждого сбора данных создаются два файла данных (PNG, CSV); файлы можно экспортировать с помощью флэш-накопителя USB или по беспроводной сети через сети Wi-Fi®, если они совместимы.

Устройство хранит до 999 отсчетов, которые можно загрузить на компьютер и в Excel для дальнейшей обработки.

Точные подсчеты обеспечиваются большим размером выборки данных

Как и в случае с другими технологиями, основанными на проточной цитометрии (где клетки проходят одну за другой через жидкостный канал мимо детектора), точные данные обеспечиваются за счет больших размеров выборки, которых не могут достичь визуальные счетчики, поскольку они основаны на рассеянии. клеток разбросаны по одному микроскопическому полю. Счетчик Scepter™ 3.0 возвращает данные гистограмм из тысяч клеток на образец, обеспечивая более точные подсчеты.

Эта система предназначена только для исследовательских целей и была протестирована с типами часто используемых клеток.

Информация для заказа

PHCC360KIT Scepter 3.0 Handheld Automated Cell Counter (с набором 50 датчиков 60 микромоль)
PHCC340KIT Scepter 3.0 Handheld Automated Cell Counter (с набором 50 датчиков 40 микромоль)

Комплект поставки

1 автоматический портативный счетчик клеток Scepter 3.0
1 флакон с тестовой бусиной
1 зарядная станция с монтажным комплектом
Упаковка 50 датчиков (40 микромоль для комплекта PHCC340KIT и 60 микромоль для PHCC360KIT)

Зарядная станция для Scepter 3.0 может быть установлена (с помощью монтажного комплекта) в нескольких вариантах монтажа или может храниться стационарно на столе.
Монтажный комплект для зарядной станции Scepter 3.0 используется для установки зарядной станции Scepter 3.0 в нескольких вариантах монтажа, освобождая ценное пространство в вытяжном боксе или на лабораторном столе.

Аксессуары

PHCC3BEADS Scepter 3.0 Test Bead Vial (флакон с тестовой бусиной)

PHCC360050 Scepter 3.0 Cell Counter Sensors, 60 µm sensors designed to count particles between 6 µm & 36 µm pkg of 50 ea
PHCC360250 Scepter 3.0 Cell Counter Sensors, 60 µm sensors designed to count particles between 6 µm & 36 µm pkg of 250 ea
PHCC360500 Scepter 3.0 Cell Counter Sensors, 60 µm sensors designed to count particles between 6 µm & 36 µm pkg of 500 ea

PHCC340050 Scepter 3.0 Cell Counter Sensors, 40 µm sensors designed to count particles between 4 µm & 18 µm pkg of 50 ea
PHCC340250 Scepter 3.0 Cell Counter Sensors, 40 µm sensors designed to count particles between 4 µm & 18 µm pkg of 250 ea
PHCC340500 Scepter 3.0 Cell Counter Sensors, 40 µm sensors designed to count particles between 4 µm & 18 µm pkg of 500 ea

PHCC3CHARG Scepter 3.0 Charging Station (Зарядная станция)
PHCC3WKIT Scepter 3.0 Mounting Kit (Монтажный комплект)

Лаборатории, занимающиеся культивированием клеток, нуждаются в методах подсчета и измерения клеток, которые были бы точными и последовательными для различных размеров клеток и фенотипов.

Некоторые автоматические счетчики требуют, чтобы ячейки находились в PBS, что может снизить производительность, требуя замены буфера. Чтобы быть эффективной частью поддержания клеточной культуры и подготовки к эксперименту, метод подсчета клеток также должен быть в состоянии учитывать клетки там, где они живут: в среде, с добавлением FBS или без него.

ПРОБОПОДГОТОВКА И ПРОЦЕСС ПОДСЧЁТА

Базовые приготовления
Начните с одноклеточной суспензии, разбавленной до общего объема 100 мкл (рекомендуется) до концентрации от 10 000 до 500 000 клеток/мл в микроцентрифужной пробирке или лунке планшета.

Начало работы
Включите цитометр Scepter™, нажав кнопку управления на задней панели прибора, и дождитесь появления инструкций на экране.
После появления запроса прикрепите датчик к концу блока Scepter™ так, чтобы сенсорная панель электрода была обращена к передней части прибора, и вы увидите подробные инструкции для каждого шага процесса подсчета.
50 мкл клеточной суспензии втягивается во встроенный в датчик прецизионно спроектированный микроканал.

Процесс подсчета

Импеданс Коултера является более точным методом по сравнению с гемоцитометрией и автоматическим визуальным подсчетом, демонстрируя меньшие средние коэффициенты вариации по сравнению с этими методами. Вот как это работает:

Точные объемы разбавленной клеточной культуры втягиваются в сенсор Scepter 3.0.
Сенсор обнаруживает каждую попавшую в датчик клетку и, таким образом, рассчитывается концентрация клеток. Сенсор также измеряет размеры клеток и их объемы с субмикронным и субпиколитровым разрешением, что позволяет цитометру Scepter 3.0 отображать гистограмму распределения размера или объема клеток.

При проходе клеток через отверстие в датчике, сопротивление увеличивается, и, согласно закону Ома (V=IR, где V=напряжение, I=ток и R=сопротивление), это увеличение сопротивления вызывает последующее увеличение напряжения.
Изменения напряжения записываются в виде всплесков с каждой проходящей ячейкой.
Пики одинакового размера объединяются в гистограмму и подсчитываются.
Эта гистограмма дает количественные данные о морфологии клеток, которые можно использовать для оценки качества и здоровья клеточной культуры.

Иммуномониторинг на основе размера с использованием ручного счетчика клеток Scepter™ 3.0

ВВЕДЕНИЕ

Циркулирующая иммунная система человека, представленная в виде единого снимка в образце крови, состоит из многих типов клеток с различными функциональными профилями, которые действуют согласованно, защищая организм от вторжения патогенов. Фактически, большинство биологических образцов или культивируемых клеток представляют собой гетерогенные смеси клеток, различающихся по типу, функциям или состоянию здоровья. Такие различия в клеточных атрибутах чаще всего выявляются путем измерения вариаций экспрессии поверхностных маркеров с помощью многопараметрической проточной цитометрии. Однако существует множество случаев, когда типы или состояния клеток в образце могут различаться и, следовательно, быть различимыми только по размеру.

В этих рекомендациях по применению представлены два примера экспериментов с использованием чувствительной способности счетчика клеток Scepter™ 3.0 различать размеры для быстрой качественной оценки отдельных клеточных популяций в сложной среде образцов PBMC.

МЕТОДЫ

Подготовка образцов крови человека

Фракции PBMC человека выделяли из цельной гепаринизированной крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте плотности Ficoll® Paque. 10 мл крови разбавляли 1:3 фосфатно-солевым буфером (PBS) и наслаивали на 15 мл фиколла. Образцы центрифугировали при 400 g в течение 30 минут без тормоза. Полученный слой PBMC извлекали путем тщательного пипетирования и дважды промывали PBS (1000×g в течение 8 минут). После последнего центрифугирования клеточные осадки ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (среда R10).

Культура клеток и активация

Все эксперименты по культивированию проводили на среде R10. PBMC (500 000/мл, 24-луночные планшеты) стимулировали в течение 2 дней в присутствии растворимого моноклонального антитела против CD28 (2 мкг/мл) на планшетах, предварительно покрытых моноклональным антителом против CD3 (10 мкг/мл). Митогенную стимуляцию проводили в присутствии фитогемагглютинина (ФГА, 0,5-5 мкг/мл). Образцы культур отбирали через 24 и 48 часов после стимуляции для анализа.

Scepter™ 3.0 Подсчет клеток и определение размера

Счетчик клеток Scepter™ 3.0 использовался для подсчета образцов в соответствии с простыми инструкциями на экране для каждого этапа процесса. Датчик на 40 мкмоль, погружали в образец (пробирка 1,5 мл) и через сенсорную апертуру втягивали 50 мкл клеточной суспензии. Счетчик клеток Scepter™ 3.0 обнаруживает каждую клетку, проходящую через апертуру, рассчитывает концентрацию и отображает распределение популяции образца в виде гистограммы в зависимости от размера (диаметра или объема). После завершения датчик отсоединяется с помощью кнопки EJECT.

Подсчет PBMC и определение субпопуляции с помощью проточной цитометрии

Для подсчета PBMC 10 мкл каждого образца смешивали со 190 мкл реагента Guava® ViaCount и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Данные о подсчете клеток и жизнеспособности были получены на проточном цитометре Guava® easyCyte™ HT с использованием программного обеспечения ExpressPro™.

Для определения подмножества 1×105 PBMC ресуспендировали в 100 мкл PBS + 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Отдельные субпопуляции клеток различали путем окрашивания следующей комбинацией флуоресцентно меченных антител: CD3-PE (Т-клетки), CD19-Alexa Fluor® 488 (В-клетки), CD16/56-APC (NK-клетки) и CD14- PE-Cy7 (моноциты). Однократно окрашенные образцы и изотипические контроли были включены в каждое окрашивание, чтобы обеспечить правильную настройку прибора. Образцы инкубировали при 4°C в течение 30 минут, дважды промывали PBS и ресуспендировали в 200 мкл PBS. Было получено и проанализировано 5000 клеток/образец, как описано ранее.

Для активационных культур собирали аликвоту клеток, как описано. Для различения активированных фракций образцы окрашивали анти-CD3-PE, анти-CD25-APC и анти-CD69-Alexa Fluor® 488; приобретенный; и проанализированы, как описано ранее.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Количественная дискриминация моноцитов-лимфоцитов в свежевыделенных PBMC

Счетчик клеток Scepter™ 3.0 различает частицы исключительно по размеру в соответствии с принципом Коултера. Чтобы выяснить, можно ли использовать устройство для анализа PBMC, мы сначала попытались понять распределение частиц по размерам, присутствующих в этих гетерогенных образцах, с помощью проточной цитометрии.

Количественная дискриминация с использованием проточной цитометрии

Изоляты PBMC состоят из живых клеток (многочисленных подтипов), мертвых клеток и дебриса. Компоненты жизнеспособности и дебриса могут сильно различаться в зависимости от свойств, присущих источнику крови, а также методов хранения и обращения с исходным образцом крови. Чтобы понять относительную долю трех типов частиц, образцы окрашивали двухцветным флуоресцентным красителем и анализировали с помощью проточной цитометрии. Этот реагент способен отличать жизнеспособные клетки от нежизнеспособных на основе дифференциальной проницаемости для двух ДНК-связывающих красителей. Краситель, проникающий в клетки, окрашивает все ядросодержащие клетки; непроницаемый для клеток краситель ярко окрашивает фракции умирающих и мертвых клеток, в то время как дебрис остается неокрашенным.

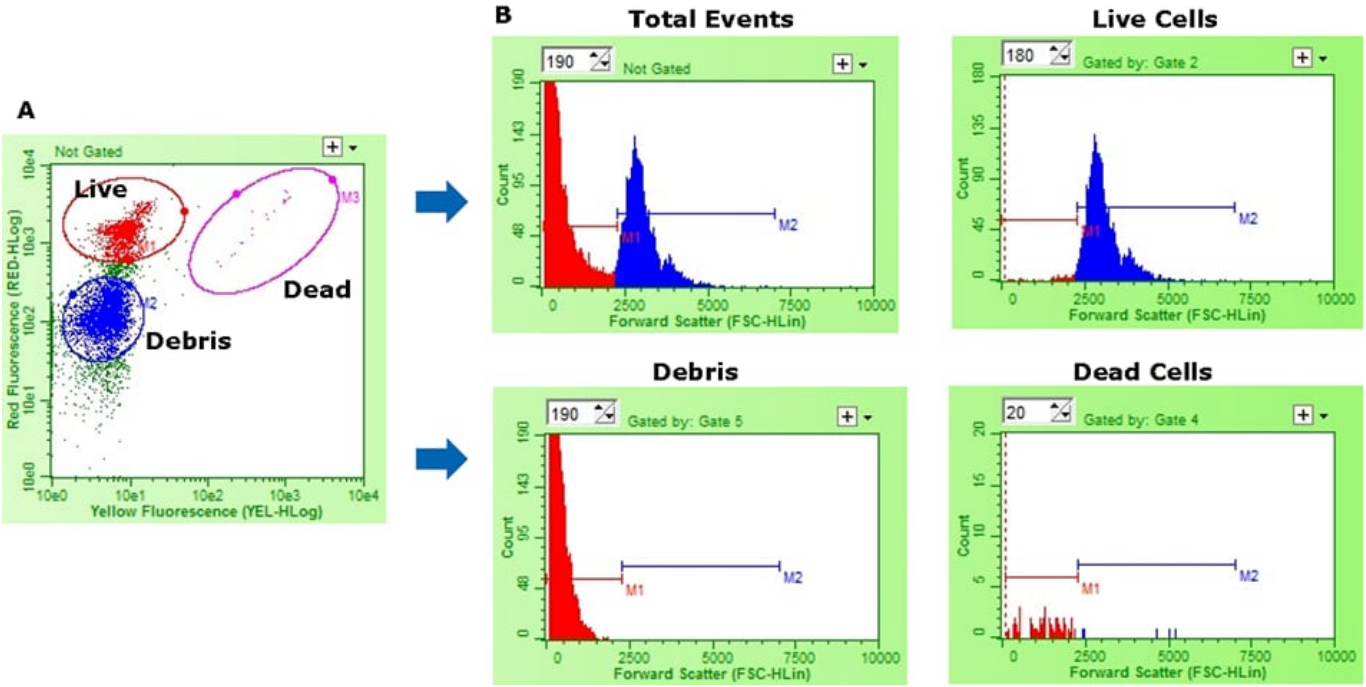


Рисунок 1. Репрезентативные данные проточной цитометрии, демонстрирующие различение живых клеток от мертвых и дебриса по размеру. (A) Фракции живых клеток (красный), мертвых (розовый) и дебриса (синий) определяли с помощью реагента ViaCount®. (B) Гистограммы демонстрируют распределение частиц внутри каждой фракции в зависимости от размера (измеряется прямым рассеянием).

Компартмент PBMC занимают четыре основных типа клеток: Т-клетки, В-клетки, NK-клетки и моноциты. Чтобы исследовать распределение этих клеток по размеру, PBMC окрашивали флуоресцентными антителами, специфичными для каждого типа клеток (рис. 2). Точечные диаграммы подтвердили определение каждого типа клеток по соответствующему поверхностному маркеру. На рисунке 2С показано, что в покоящихся PBMC клетки Т, В и NK обычно были меньше по размеру (более низкое значение прямого рассеяния), чем моноциты CD14+. Эти данные свидетельствуют о том, что компартмент моноцитов однозначно отличается от всех других лимфоцитов только по размеру.

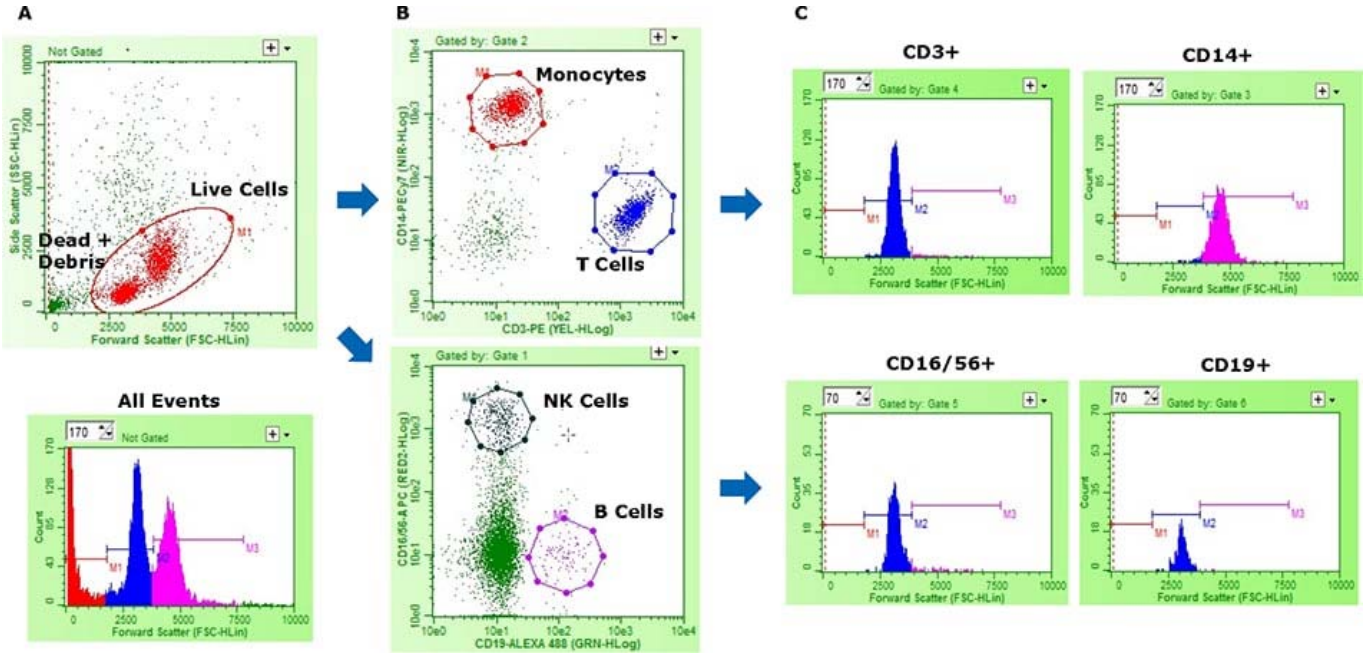


Рисунок 2. Репрезентативные данные анализа методом многоцветной проточной цитометрии PBMC человека. (A) 2D-график - живые клетки (красный) отличаются от дебриса/мертвых клеток (зеленый) по прямому и боковому рассеянию. График гистограммы изображает те же данные, определенные прямым рассеянием. (B) Живые клетки из (A) фракционируют на подмножества на основе экспрессии CD3, CD19, CD16/56 и CD14. (C) Гистограммы показывают локализацию четырех подмножеств относительно двух пиков, определяемых прямым рассеянием. Три основные подгруппы лимфоцитов разрешились в пределах меньшего (синего) пика, в то время как моноциты CD14+ ограничены большим (розовым) пиком.

Количественная дискриминация с использованием Scepter™ 3.0

Чтобы проверить способность сенсора Scepter™ 3.0 с размером пор 40 мкм отличать лимфоциты от моноцитов, свежеприготовленные образцы PBMC анализировали с использованием счетчика клеток Scepter™ 3.0 и методом проточной цитометрии. Репрезентативные графики гистограмм представлены на рисунке 3. Три основных пика (обломки, лимфоциты и моноциты) можно было различить только по размеру при каждом из методов анализа. Всего было проанализировано семь образцов PBMC (табл. 1). В соответствии с ранее опубликованными значениями средний средний диаметр клеток составлял 7,52 ± 0,24 мкм и 10,73 ± 0,34 мкм для лимфоцитов и моноцитов соответственно. Относительный процент, наблюдаемый для двух подмножеств, был довольно разным, вероятно, из-за различий в состоянии здоровья доноров и, возможно, в подготовке образцов. Как показано, относительный процент каждого подмножества был вполне согласованным для трех методов анализа со значениями, различающимися менее чем на 10%. Следует отметить, что гейтирование на основе размера (на любой платформе) подвержено смещению при размещении, особенно там, где между перекрывающимися популяциями нет истинных различий.

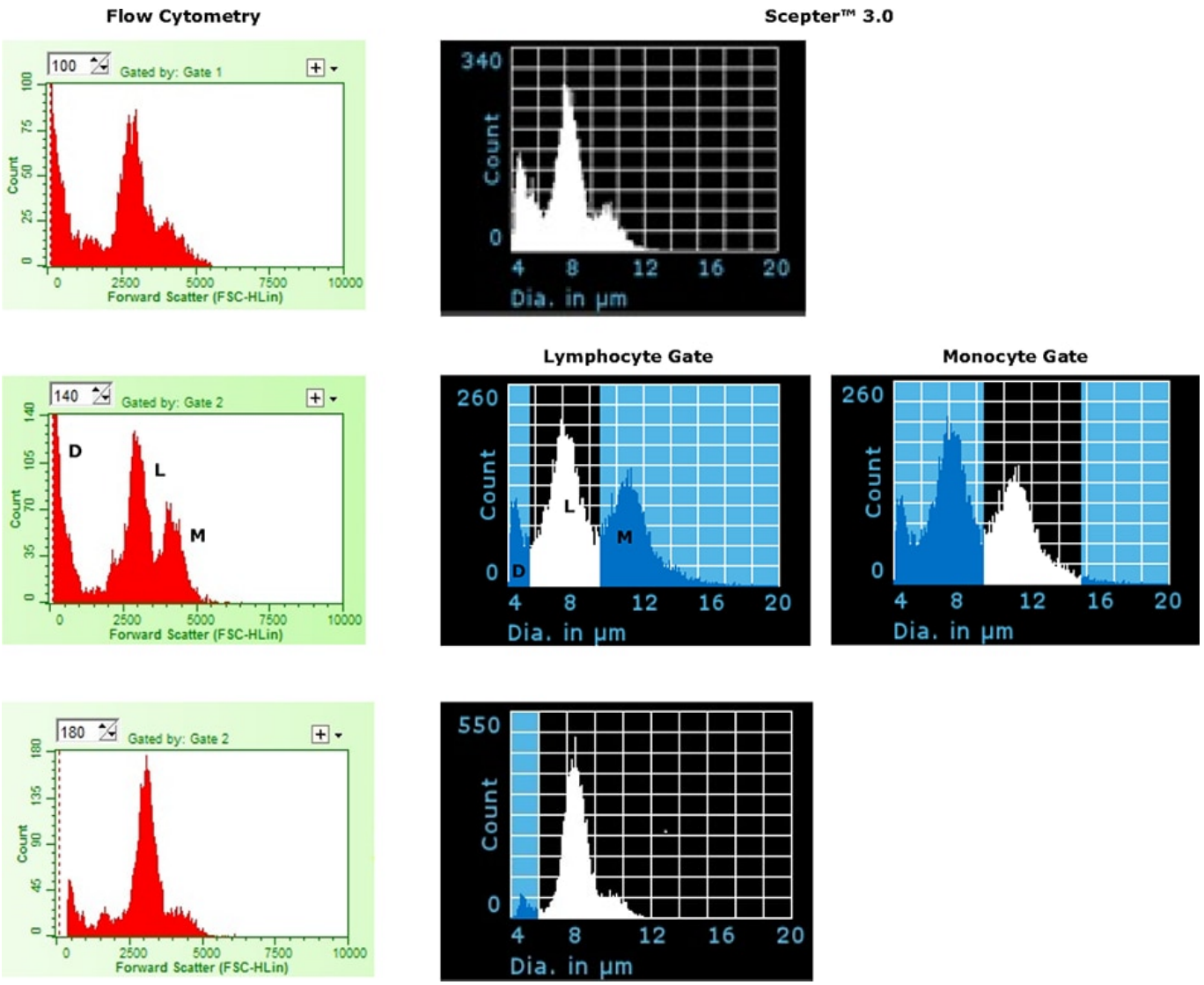


Рисунок 3. Репрезентативные примеры сравнения графиков гистограмм для образцов PBMC человека, полученных с помощью счетчика клеток Scepter™ 3.0 (диаметр) и с помощью проточной цитометрии (прямое рассеяние). Графики демонстрируют три отчетливых пика, соответствующие фракциям дебриса/мертвых клеток (D), лимфоцитов (L) и моноцитов (M). Для среднего образца показаны две гистограммы Scepter™, демонстрирующие функцию стробирования на устройстве.

Относительная частота				
Образец	Клеточная фракция	Scepter™ 3.0[1]	Forward Scatter[2]	Staining[3]
1	Lymphocyte	80	78	75
	Monocyte	20	21	25
2	Lymphocyte	79	81	79
	Lymphocyte	21	19	20
3	Lymphocyte	65	66	62
	Monocyte	35	34	37
4	Lymphocyte	86	86	85
	Monocyte	14	14	15
5	Lymphocyte	50	52	51
	Monocyte	50	48	48
6	Lymphocyte	65	66	65
	Monocyte	35	34	35
7	Lymphocyte	68	71	66
	Monocyte	32	29	34

Таблица 1. Частота субпопуляций лимфоцитов и моноцитов из семи свежевыделенных образцов PBMC.

Аликвоты от каждого анализировали с помощью проточной цитометрии и с использованием счетчика клеток Scepter™ 3.0.

1) Значения, полученные с помощью дополнительного стробирования на графике гистограммы диаметра с помощью Histogram Explorer.
2) Значения, полученные из гистограммы прямого рассеяния на основе общего количества зарегистрированных событий.
3) Частоты окрашивания получены следующим образом: % лимфоцитов = % CD3+ Т-клеток + % CD19+ В-клеток + % CD16/56 + NK-клеток; % моноцитов = % клеток CD14+.

Большой процент клеточных анализов в иммунологических приложениях, включая ELISpots и другие анализы, в которых показания основаны на частоте респондентов, требуют точного определения начального количества клеток. Чтобы оценить точность подсчета счетчика клеток Scepter™ 3.0, образцы PBMC оценивали в диапазоне концентраций клеток.

Как видно на рисунке 4A, счетчик клеток Scepter™ 3.0 показал высокую линейность для нескольких образцов при различных исходных концентрациях (R2 > 0,99). Кроме того, по сравнению с капиллярным проточным цитометром, способным к прямому подсчету клеток, две платформы работали примерно одинаково при подсчете общего количества клеток или только лимфоцитов (рис. 4B и 4C).

В целом стандартное отклонение среди повторов было значительно ниже для счетчика клеток Scepter™ 3.0, чем для проточной цитометрии; это, вероятно, связано с разницей в выборке между двумя платформами. Счетчик клеток Scepter™ 3.0 собирает образцы на основе механизма прецизионного насоса, в то время как образцы пипетируются вручную в начале анализа потока.

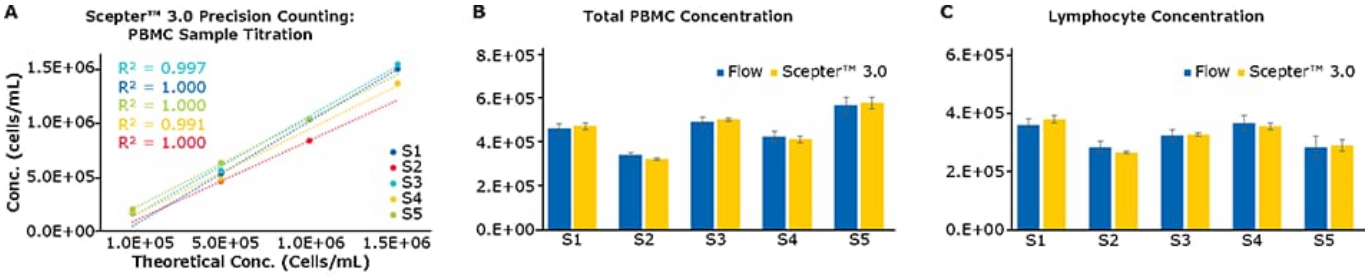


Рисунок 4. (A) Счетчик клеток Scepter™ 3.0 работает с высокой степенью линейной точности в диапазоне образцов PBMC при различных входных данных клеток. (B, C) Для тех же образцов определение концентрации для общего количества клеток и лимфоцитов сравнивали с проточным цитометром на капиллярной основе. Эта конструкция не требует оболочки во время сбора образцов, что позволяет проводить прямые измерения количества клеток.

Качественное профилирование активации лимфоцитов

В ответ на антигенные стимулы иммунные клетки претерпевают многочисленные физические и функциональные изменения, включая увеличение размера клеток, секрецию цитокинов и модуляцию поверхностных маркеров, таких как CD69 и CD25. Анализы, измеряющие изменения в активации лимфоцитов, обычно используются для выявления паттернов иммунного ответа в клинической диагностике и разработке терапии. Для решения проблемы потенциального использования счетчика клеток Scepter™ 3.0 для быстрого качественного мониторинга активации иммунных клеток, представленной увеличением размера клеток, свежевыделенные PBMC стимулировали в культуре с использованием двух различных механизмов: (1) ко-стимуляция, опосредованная антителами против CD3/CD28. Т-клеточного рецептора и (2) митогенной активации ФГА.

На рис. 5 способность счетчика клеток Scepter™ 3.0 обнаруживать активацию клеток сравнивалась с проточным цитометрическим анализом на основе размера. В то время как счетчик клеток Scepter™ 3.0 мог обнаруживать присутствие более крупной фракции активированных клеток, устройство было ограничено в своей способности действительно различать активированные и невосприимчивые клетки. Точно так же проточный цитометр также не мог точно определить два состояния только по размеру; для точных количественных определений требовалось использование поверхностных маркеров (CD69+, CD25+)

(данные не представлены). Аналогичная проблема показана на рис. 6, где наложения гистограмм используются для одновременного отображения нескольких выборок. Ингибирующим фактором в обоих случаях, вероятно, является повышенное присутствие дебриса и мертвых клеток, которые перекрываются с нижним концом фракции живых клеток. Помимо активации и, как следствие, изменения размера клеток, стимуляция также вызывает быструю пролиферацию активированных клеток и гибель невосприимчивых клеток. Эта проблема представляет собой наглядную демонстрацию ограничений счетчика клеток Scepter™ 3.0 и всех других аналитических методов, основанных на размере, в отношении количественного анализа подмножества.

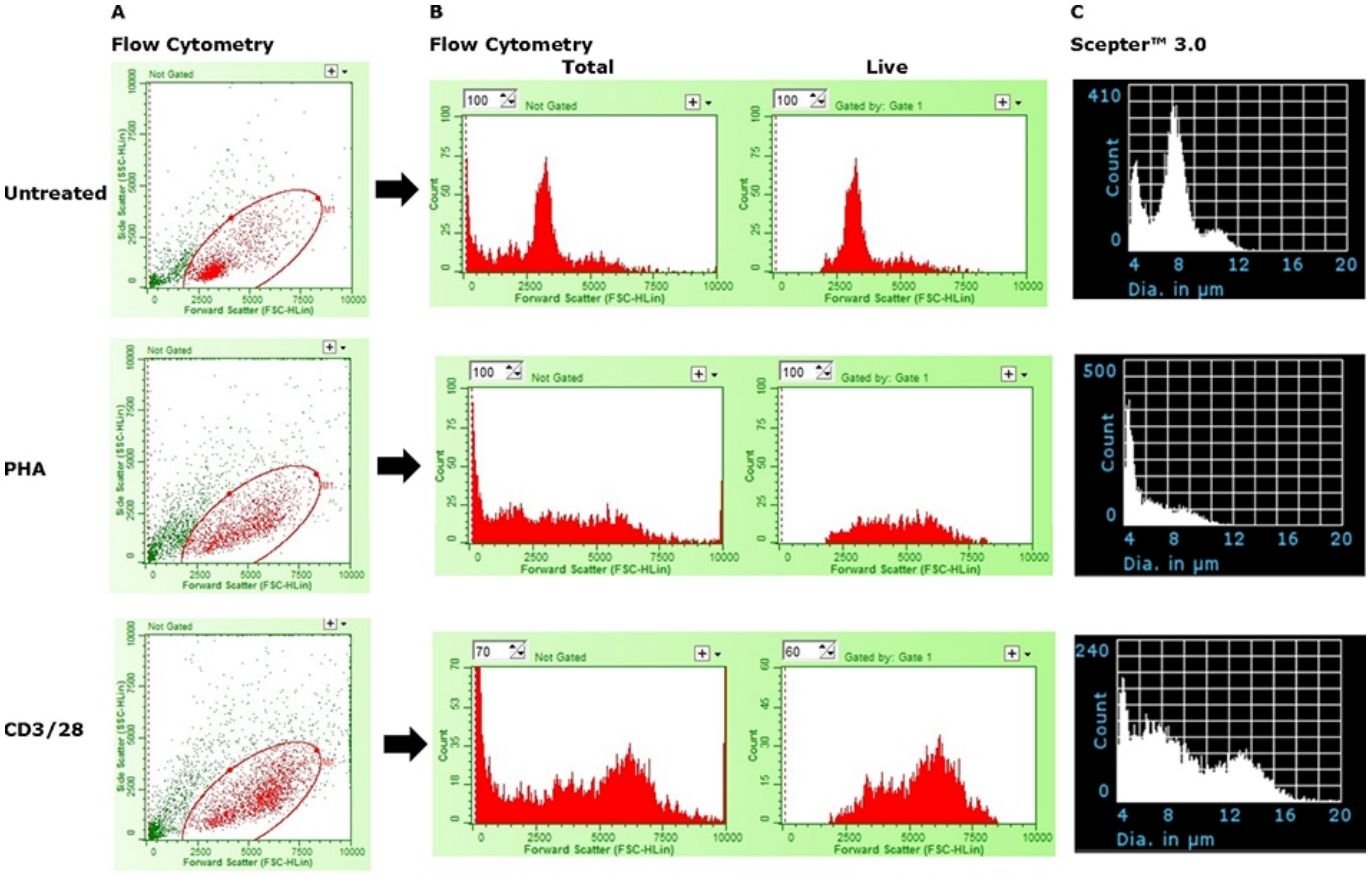
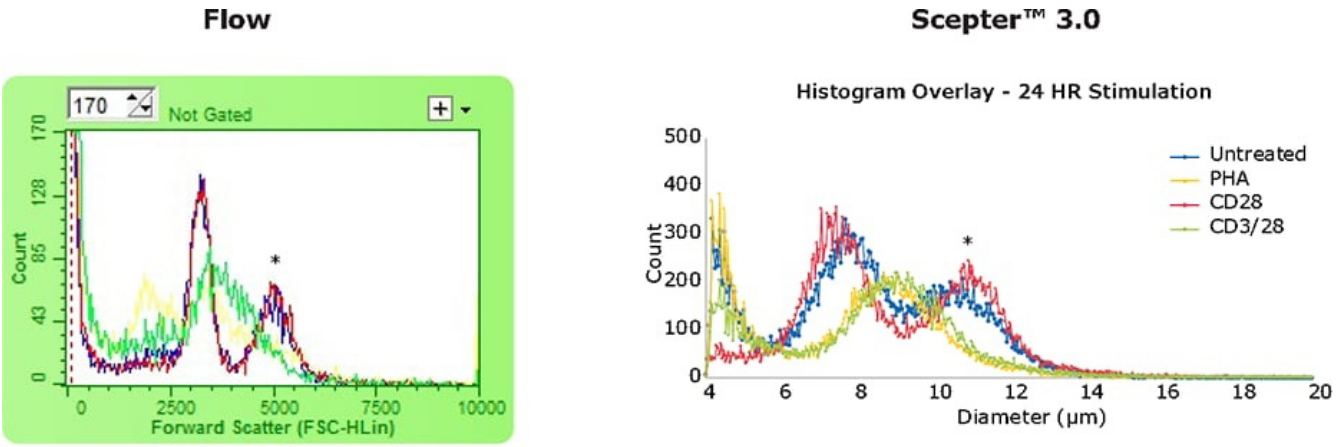
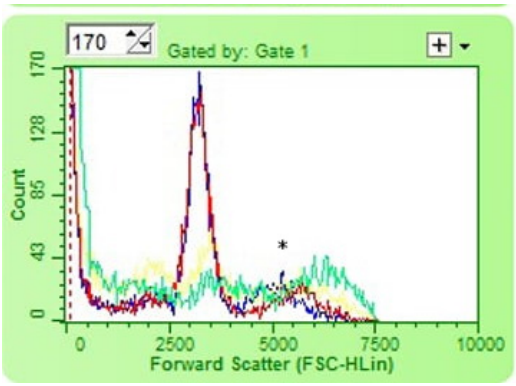


Рисунок 5. Ограничения счетчика клеток Scepter™ 3.0 в отношении абсолютного различения активированных и невосприимчивых клеток. (A) Живые клетки (красный) отличали от мертвых клеток и дебриса (зеленый) с помощью реагента ViaCount™. (B) Две гистограммы в каждой строке показывают относительное распределение общего количества и живых событий в зависимости от размера частиц (прямое рассеяние). (C) Данные гистограммы из тех же образцов, полученные на счетчике клеток Scepter™ 3.0 с использованием датчиков 40 мкм.





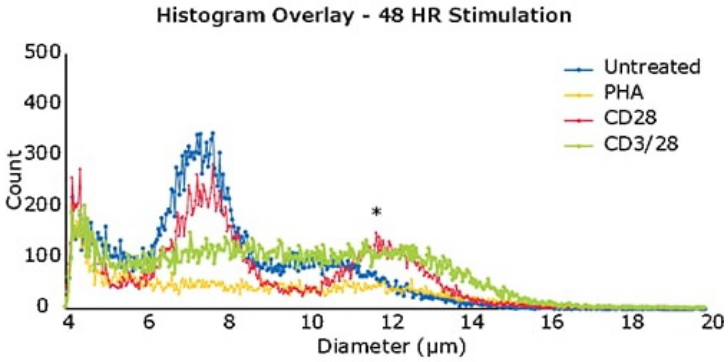


Рисунок 6. Наложения гистограмм (проточная цитометрия – прямое рассеяние; Scepter™ 3.0 – диаметр клеток), изображающие изменение размера PBMC в ответ на стимуляцию. Звездочка (*) обозначает персистенцию моноцитов CD14+ в необработанных культурах и культурах, стимулированных только CD28 (определяется окрашиванием клеточной поверхности, данные не показаны). Данные показывают, что одних аналитических методов, основанных на размере, недостаточно для полного количественного анализа подмножества активированных PBMC.

РЕЗЮМЕ

Оценка иммунного ответа на потенциально опасные воздействия является важным инструментом в оценке патогенности и токсичности. Наличие упрощенных методов определения состояний активации клеток и измерения различий в относительной частоте множественных типов клеток в образцах или смешанных культурах полезно для ускорения исследований в этих областях. Мы представили данные, свидетельствующие о том, что счетчик клеток Scepter™ 3.0 может количественно определять общее количество клеток и подтипов клеток в свежевыделенных PBMC и культивируемых образцах. / или содержание мертвых клеток, затрудняющее точное различение подмножеств клеток, основанное исключительно на измерении размера. Проточная цитометрия, благодаря возможности многопараметрического флуоресцентного обнаружения, может преодолеть эти ограничения. Однако гораздо более сложные платформы требуют серьезной настройки, обучения и времени для работы с навыками. Счетчик клеток Scepter™ 3.0, напротив, представляет собой удобный инструмент, который можно использовать в боксе для тканевых культур, чтобы получить качественное представление о состоянии клеток и клеточных реакциях примерно за 30 секунд.